

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

Facultad de Medicina

UTILIDAD DE LA  
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA  
EN EL DIAGNOSTICO DE LAS  
INFECCIONES CAUSADAS POR  
*B. pertussis*

TESIS DOCTORAL

**Enrique Bergón Jiménez**

DEDICATORIA:

A Concha y a las futuras  
doctoras Marta y Elena.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Profesor Don Juan J. Picazo de la Garza, Catedrático de Microbiología Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por sus valiosos consejos técnicos y permanente cordialidad.

Al Doctor Don José Ramón Domínguez Pérez, Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Getafe, por su magnífica colaboración y constante aliento para la elaboración de esta Tesis Doctoral.

A todos los pediatras del Hospital Universitario de Getafe, representados en la figura de su Jefe de Servicio Don Blás Taracena del Piñal, por el enorme interés demostrado en la búsqueda de la salud de sus pacientes y en la realización de este trabajo.

Al Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario de Getafe que dirige la Dra D<sup>a</sup> Elena Miravalles González por su colaboración en este trabajo.

A todo el personal del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Getafe por la gran ayuda prestada en cuantas veces se le solicitó.

1.- INTRODUCCION	14
1.1.- El problema de la tos persistente	19
1.2.- Papel de <i>B. pertussis</i> en la tos persistente	20
1.2.1.- <u>Definición de la tosferina</u>	20
1.2.2.- Historia de la tosferina	21
1.2.3.- La tosferina en la etapa postvacunal	22
1.2.4.- Papel del adulto en la perpetuación de la tosferina	24
1.3.- Problemas diagnósticos de la tosferina	26
1.3.1.- Problemas del diagnóstico clínico	26
1.3.2.- Problemas del diagnóstico bacteriológico	26
1.4.- Definición clínica de tosferina	28
1.5.- Epidemiología de la tosferina	28
1.6.- Incidencia de la tosferina	30
1.6.1.- Incidencia de tosferina en Estados Unidos	30
1.6.2.- Incidencia de tosferina en España	31
1.6.3.- Incidencia de tosferina en la Comunidad de Madrid	32
1.7.- Historia de <i>Bordetella pertussis</i>	33
1.7.1.- Biología del género <i>Bordetella</i>	36
1.7.2.- Propiedades del género <i>Bordetella</i>	40
1.8.- Características clínicas de la tosferina	43
1.8.1.- Transmisión de la tosferina	45
1.8.2.- Patogenia de la tosferina	46
1.8.2.1.- Anidamiento en la mucosa respiratoria	46



1.8.2.2.- Evasión de los mecanismos de defensa del huésped	47
1.8.2.3.- Producción del daño local	47
1.8.2.4.- La enfermedad sistémica	47
1.9.- Factores producidos por el género <i>Bordetella</i>	49
1.9.1.- Hemaglutinina filamentosa (FHA) y fimbria	49
1.9.2.- Factor promotor de la linfocitosis o toxina pertussis	52
1.9.3.- Citotoxina traqueal	55
1.9.4.- Adenilato-ciclasa	56
1.9.5.- Aglutinógenos	57
1.9.6.- Lipopolisacáridos (LPS)	60
1.9.7.- Toxina dermonecrótica	61
1.9.8.- Otras sustancias	62
1.10.- Metodologías para el diagnóstico de las infecciones causadas por <i>B. pertussis</i> . La insensibilidad del cultivo. Alternativas diagnósticas	63
1.10.1.- Metodologías basadas en la detección de la propia bacteria o sus productos	64
1.10.1.1.- Inmunofluorescencia directa contra la <i>B. pertussis</i>	65
1.10.1.2.- Contrainmunolectroforesis	65
1.10.1.3.- Pruebas diagnósticas basadas en la toxina pertussis	66

1.10.1.4.- Pruebas diagnósticas basadas en la detección de adenilato-ciclasa	67
1.10.1.5.- Pruebas diagnósticas basadas en el estudio del genoma	67
1.10.1.6.- Otras pruebas	69
1.10.2.- Metodologías basadas en la detección de anticuerpos contra la bacteria o sus productos	69
1.10.2.1.- Pruebas basadas en la medición de la actividad del complemento	70
1.10.2.2.- Pruebas basadas en la neutralización de la actividad de sustancias producidas por la bacteria	70
1.10.2.3.- Pruebas basadas en la aglutinación	71
1.10.2.4.- Pruebas basadas en la inmunofluorescencia indirecta	71
1.10.2.5.- Pruebas basadas en enzimoimmunoensayos	72
2.- OBJETIVOS	73
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	77
3.1.- Muestra	78
3.1.1.- Area demográfica	78
3.1.2.- Datos demográficos	78
3.1.3.- Cohorte de estudio	79
3.1.4.- Encuesta	79
3.1.5.- Período de tiempo del estudio	81

3.1.6.- Cohorte de referencia	82
3.1.6.1.- Procedencia de los especímenes estudiados	83
3.1.6.2.- Estratificación de la cohorte control	84
3.2.- MÉTODOS	85
3.2.1.- Aislamiento de <i>B. pertussis</i>	85
3.2.1.1.- Pautas para la toma de muestra bacteriológica	86
3.2.1.2.- Tipos de torundas para la recogida de muestra	87
3.2.1.3.- Medio de aislamiento	88
3.2.1.4.- Medio de transporte o enriquecimiento	91
3.2.1.5.- Control de calidad de los medios	91
3.2.1.6.- Atmósfera de incubación	92
3.2.2.- Inmunofluorescencia directa	93
3.2.2.1.- Protocolo de inmunofluorescencia	94
3.2.2.2.- Preparación de los sueros anti- <i>B. pertussis</i> / <i>B. paraptussis</i> marcados con isocianato de fluoresceína	96
3.2.2.3.- Tampón PBS 0.15M, pH 7.6	96
3.2.2.4.- Solución de montaje. Glicerina tamponada	97
3.2.3.- Inmunofluorescencia indirecta	97
3.2.3.1.- Preparación de extensiones de <i>Bordetella pertussis</i> en portas	97
3.2.3.2.- Control de calidad de las extensiones de <i>Bordetella pertussis</i>	98
3.2.3.3.- Protocolo de inmunofluorescencia indirecta	99

3.2.3.4.- Control de calidad de la inmunofluorescencia indirecta	101
3.2.3.5.- Sueros anti-inmunoglobulinas humanas marcados con isocianato de fluoresceína, específicos de isotipo	101
3.2.4.- Otras determinaciones	102
3.3.- Algunas consideraciones teóricas sobre el intervalo de referencia	102
3.4.- Estudio estadístico	104
3.5.- Preparación del manuscrito	105
4.- RESULTADOS	106
4.1.- Serología de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> en los recién nacidos	107
4.2.- Niveles de Anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> previos al calendario de inmunizaciones	111
4.2.1.- Niveles e isotipos de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> en neonatos	111
4.2.2.- Niveles e isotipos de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> en lactantes de un mes de edad	115
4.2.3.- Niveles e isotipos de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> en lactantes entre dos y tres meses de edad	116
4.2.4.- Resumen de la situación humoral frente a la <i>B. pertussis</i> en los lactantes menores de tres meses	120
4.3.- Seroprevalencia, títulos e isotipos de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> en lactantes incluidos en el calendario de inmunizaciones	123
4.3.1.- Seroprevalencia de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> en lactantes de tres meses de edad	123

4.3.2.- Seroprevalencia de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> en lactantes de cuatro meses	125
4.3.3.- Seroprevalencia de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> en lactantes de cinco meses	126
4.3.4.- Seroprevalencia de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> en lactantes de seis meses	127
4.3.5.- Seroprevalencia de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> en lactantes de siete meses	128
4.3.6.- Seroprevalencia de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> en lactantes de ocho meses	129
4.3.7.- Seroprevalencia de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> en lactantes con edades comprendidas entre los nueve y trece meses	132
4.4.- Descenso y evolución de los niveles e isotipos de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> después de haber completado el calendario de vacunas	136
4.4.1.- Niveles de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> entre los trece meses y los cuatro años de edad	137
4.4.2.- Niveles de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> entre los cuatro y cinco años de edad	144
4.4.3.- Niveles de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> entre los cinco y diez años de edad	146
4.4.4.- Niveles de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> entre los diez y quince años de edad	148
4.4.5.- Niveles de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> entre los quince y noventa años de edad	151

4.5.- Resumen de la situación humoral frente a <i>B. pertussis</i> en el grupo control	154
4.5.1.- Seroprevalencia de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> en recién nacidos y neonatos	155
4.5.2.- Seroprevalencia de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> previos al calendario de inmunizaciones	156
4.5.3.- Seroprevalencia de los anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> durante el período de inmunizaciones	157
4.5.4.- Seroprevalencia de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> entre los trece meses y cuatro años de edad	164
4.5.5.- Seroprevalencia de los anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> entre los 4 y los quince años de edad. Estimación del intervalo de referencia	167
4.5.6.- Rangos de referencia de los anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> posteriores al calendario de vacunaciones	168
4.5.7.- Seroprevalencia de los anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> en personas mayores de 15 años	169
4.5.8.- Tasa de prevalencia de tosferina serológica en la muestra de referencia	170
4.6.- Cohorte de Referencia. Concentraciones e isotipos de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> en saliva	173
4.7.- Características de la cohorte remitida para el estudio de pertussis	173
4.7.1.- Distribución de las peticiones por grupos de edades	174

4.7.2.- Distribución estacional de las peticiones de estudio de pertussis	176
4.7.3.- Características de los síntomas clínicos en la cohorte de estudio	181
4.7.3.1.- Tos	181
4.7.3.2.- Vómitos	182
4.7.3.3.- Petequias	182
4.7.3.4.- Estudio hematológico/bioquímico	183
4.7.3.5.- Estudio bacteriológico	184
4.7.3.6.- Estudios de anticuerpos en sujetos con evidencia serológica de tosferina	186
4.7.3.7.- Detección de anticuerpos en saliva	190
5.1.- Seroprevalencia de anticuerpos anti- <i>B.pertussis</i> en recién nacidos y neonatos	196
5.1.1.- Poder protector de los anticuerpos cedidos por la madre al hijo	197
5.2.- Edad de comienzo del calendario de inmunizaciones contra la tosferina	202
5.2.1.- Pautas de inmunizaciones	204
5.2.2.- Respuesta de anticuerpos a las distintas dosis de vacuna	206
5.2.3.- Tipo de anticuerpos producidos en respuesta a las vacunaciones	208
5.2.4.- Duración de la respuesta de anticuerpos evocados por las vacunaciones	209

5.2.5.- Eficacia de la vacuna	210
5.2.6.- Reacciones adversas de las vacunas con bacterias completas	216
5.3.- Vacunas acelulares	218
5.4.- Valores de referencia	221
5.5.- Prevalencia de anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> en la cohorte de referencia	222
5.5.1.- Papel de los adolescentes y adultos en la perpetuación de la pertussis	227
5.6.- Cohorte con sospecha clínica de pertussis	232
5.6.1.- Descripción de la muestra	232
5.6.2.- Distribución de las peticiones por grupos de edades	233
5.6.3.- Eficacia del diagnóstico clínico de pertussis por edades	233
5.6.4.- Rendimiento diagnóstico de los síntomas	235
5.6.5.- Estacionalidad de la demanda de estudios de pertussis	239
5.6.6.- Rendimiento del diagnóstico bacteriológico	243
5.6.6.1.- Cultivo de <i>B. pertussis</i>	243
5.6.6.2.- Fluorescencia directa sobre especímenes nasofaríngeos	248
5.6.7.- Diagnóstico serológico clínico de pertussis.	249
5.6.7.1.- Enzimoimmunoensayos o inmunofluorescencia indirecta	252
5.6.7.2.- Tipos de substratos	254



5.6.7.3.- Respuesta del isotipo IgM a las infecciones causadas por <i>B. pertussis</i>	255
5.6.7.4. Respuesta del isotipo IgA a las infecciones causadas por <i>B. pertussis</i>	257
5.6.7.5.- Respuesta del isotipo IgG a las infecciones causadas por <i>B. pertussis</i>	259
5.6.8.- Estudio de anticuerpos contra la bacteria completa o contra antígenos específicos	261
5.6.9.- Algunas peculiaridades de la respuesta humoral	263
5.6.10.- Anticuerpos anti- <i>B. pertussis</i> en las secreciones respiratorias	265
5.7.- Estimación de los posibles casos de tosferina en el Area Sanitaria 10.	267
5.8.- Respuesta a las preguntas iniciales	269
6.- RESUMEN	271
7.- CONCLUSIONES	285
8.- BIBLIOGRAFIA	291

# **1.- INTRODUCCION**

Habitualmente ocurre que el lactante o niño pequeño con tos persistente plantea uno de los problemas más frecuentes en la práctica médica diaria, siendo una de las causas las infecciones provocadas por *B. pertussis* (1). Esta bacteria es un patógeno exclusivamente humano que origina una enfermedad mediada por toxinas y caracterizada por la cronicidad de su síntoma más relevante: la tos. El cuadro clínico clásico consiste en ataques de tos paroxísticos, seguidos por un típico estridor inspiratorio laríngeo y/o vómitos. Es precisamente por la tos convulsiva por lo que se acuñaron los términos tosferina, pertussis, etc (2). El principal agente etiológico generador de los síntomas clínicos de la pertussis en los países occidentales y Estados Unidos es *B. pertussis*. *B. parapertussis* puede producir algunos cuadros clínicos semejantes (menos del 5%), pero atenuados (3-10). Por ello, el presente estudio se centrará en *B. pertussis*.

La ausencia de la sintomatología típica de pertussis que se observa en algunos lactantes, sobre todo en los menores de seis meses (11-13) y la aparición de la vacuna contra la pertussis en la década de los cuarenta (que provocó un brusco descenso de la mortalidad y morbilidad mediada por *B. pertussis*) han inducido a algunos facultativos a considerarla como una curiosidad médica, y/o a afirmar que nadie padece una infección por *B. pertussis* más allá de los doce o quince años de edad (14-17). Contrariamente a lo que se puede desprender de tales afirmaciones y a poco que se revise la bibliografía especializada actual, rápidamente se será consciente de la enorme vigencia de esta enfermedad y del importante papel desempeñado por los niños vacunados, adolescentes y adultos en la transmisión y mantenimiento endémico de las infecciones causadas por *B. pertussis* (18-34).

Uno de los motivos que han inducido a acrecentar la creencia en la práctica desaparición de la pertussis es la inespecificidad del cuadro clínico. El problema del diagnóstico clínico de la pertussis radica, entre otras cosas, en su frecuente presentación clínica atípica, tanto en lactantes pequeños, como en niños vacunados, adolescentes y adultos. Estos sujetos pueden ser fácilmente diagnosticados de procesos respiratorios banales, u otros cuadros clínicos, (11-13, 30,35-47) debido a la inespecificidad o ausencia de los síntomas tan presuntamente característicos de la pertussis como la tos paroxística, vómitos, etc (3,24,36,48-53).

Otra razón que abona la idea de la baja incidencia de las infecciones por *B. pertussis* en las poblaciones vacunadas es la escasa sensibilidad de la meta analítica de cualquier enfermedad infecciosa: el cultivo. Esta pobre sensibilidad del cultivo viene originada por la naturaleza tan exigente y delicada de esta bacteria y por la dificultad para recoger un espécimen en el período de tiempo óptimo dentro de la evolución de la enfermedad. Tal "tiempo óptimo" está ubicado dentro de las dos primeras semanas de evolución de la enfermedad, justo en un momento en que se sospecha un proceso catarral y no se plantea el diagnóstico de presunción de una pertussis. Además, cuando el clínico puede sospechar este diagnóstico, ya ha transcurrido el tiempo necesario para la síntesis de anticuerpos y la consiguiente desaparición de la bacteria de las vías respiratorias (3,9,10,13,15,17,35-37,40,48,50,54-66).

Los problemas existentes para realizar un diagnóstico clínico certero y conseguir una confirmación del diagnóstico de presunción mediante el aislamiento

del agente causal han obligado a la búsqueda de nuevas alternativas diagnósticas. Una de las cuales sería la medición del efecto, ya que no podemos identificar la causa. Es decir, la objetivación de algunas de las respuestas del huésped contra el agresor, ofreciendo la serología buenas oportunidades para tal finalidad.

En 1987, el Dr. José Ramón Domínguez Pérez me brindó la posibilidad de realizar la Tesis Doctoral sobre el estudio de la *"Utilidad de un método serológico para el diagnóstico de las infecciones producidas por Bordetella pertussis"*.

La prueba tendría que ser sencilla, sensible, específica, precisa, económica y de fácil implementación en el laboratorio. De entre los métodos serológicos con finalidad diagnóstica aquellos que pudieran diseccionar la respuesta inmunológica humoral, proporcionarían una información más rápida, emanada de la dinámica temporal de la respuesta de cada clase de inmunoglobulina (IgG, IgA, IgM). Esto evitaría el retraso intrínseco de los viejos métodos serológicos (aglutinación, fijación del complemento, etc.) al necesitar dos especímenes espaciados en el tiempo (2 a 4 semanas).

La inmunofluorescencia indirecta o los enzimoimmunoensayos son pruebas válidas para su utilización en el serodiagnóstico al permitir estudiar los distintos isotipos de anticuerpos. En general, el enzimoimmunoensayo tiene la ventaja de poder ser automatizado y evita la subjetividad inherente al lector u observador de la fluorescencia. Presenta los inconvenientes de la estandarización y el requerimiento de un número determinado de especímenes para obtener una rentabilidad a la

ejecución de la prueba. Cuando la finalidad es serodiagnóstica, y no seroepidemiológica, las demandas de estudios de pertussis al laboratorio estarán espaciadas en el tiempo y, por la propia naturaleza diagnóstica de la petición, el resultado no podrá sufrir un retraso importante, todo lo cual resta operatividad al enzimoimmunoensayo. Así pues, se prefirió la inmunofluorescencia indirecta por su sencillez, requerimiento de poca atención manual por parte del técnico del laboratorio, economía, fiabilidad y posibilidad de ser ejecutable en cualquier momento, sin necesidad de un número determinado de especímenes.

Para la interpretación de los resultados se plantearon varias alternativas. Una podría ser la observación de un cambio superior a cuatro veces en la magnitud del resultado. Esto tenía la ventaja de no requerir unos valores de referencia, pero generaba una gran demora en la obtención de conclusiones, invalidando la finalidad diagnóstica. Otra alternativa podría ser comparar el resultado obtenido en el paciente con los resultados derivados de una cohorte control de características similares. El problema residía en la selección de los individuos que iban a integrar la cohorte control; habría que tener la seguridad de no estar incluyendo individuos con infecciones subclínicas (únicamente evidenciables por la respuesta de anticuerpos), que elevarían los valores de referencia, disminuyendo así la sensibilidad de la prueba. La tercera alternativa, que fue la elegida en este trabajo, consistió en el conocimiento poblacional de la evolución de los anticuerpos dirigidos contra la *B. pertussis*, desde el nacimiento (en sangre de cordón) hasta la senectud, pasando por los períodos pre-vacunal, vacunal, post-vacunal, niñez, adolescencia y adultos. Esta alternativa elegida fue la más laboriosa pero permitió detectar y excluir las infecciones

subclínicas para la obtención de un rango de referencia, incrementando la sensibilidad serodiagnóstica.

En resumen, la presente investigación pretende responder a las siguientes preguntas: ¿Es la tosferina una enfermedad obsoleta?. ¿Existen las infecciones por *B. pertussis* en sujetos vacunados?. ¿Se conoce su incidencia?. ¿Por qué pasan inadvertidas?. ¿Qué dificultades diagnósticas presentan?. ¿Cómo se pueden diagnosticar?. ¿Hay alternativas al diagnóstico bacteriológico y clínico?.

### 1.1.- El problema de la tos persistente

Habitualmente ocurre que el lactante o niño con tos persistente plantea uno de los problemas más frecuentes en la práctica pediátrica, siendo motivo de inquietud familiar y de exigencias terapéuticas con frecuencia innecesarias y, en ocasiones, contradictorias. Las causas de tos persistente son muy variadas: alergia e hiperreactividad bronquial (rinitis, asma, etc), síndromes aspirativos, compresión de las vías aéreas, cardiopatías congénitas, enfermedades pulmonares preexistentes (fibrosis quística, malformaciones, etc), irritaciones inespecíficas de las vías aéreas (humo, poluciones, etc), tos psicógena y en último lugar, (sin que esto denote una menor importancia asistencial sino porque en este apartado está incluida la motivación de esta tesis), los procesos infecciosos respiratorios (infecciones víricas recurrentes, que simulan un cuadro de tos persistente, *B. pertussis*, *Chlamydia*, y

*Ureaplasma*). Son microorganismos que producen tos paroxísticas, en general de características pertusoides (1).

## 1.2.- Papel de *B. pertussis* en la tos persistente

*B. pertussis* es un patógeno exclusivamente humano que origina una enfermedad respiratoria, en un principio aguda, con una posterior cronicidad de su síntoma más relevante: la tos. Es precisamente debido a la tos convulsa, seguida de un estridor laríngeo, por lo que fue acuñado el término "tosferina" para referirse a esta enfermedad (2), o el término latino "Pertussis" (per (intenso), tussis (tos).

Aunque otras especies de bordetelas (*B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*) pueden causar cuadros clínicos parecidos, la gran mayoría de los casos y epidemias están producidos por *B. pertussis* (3-8), por lo que, principalmente, nos referiremos a esta especie.

### 1.2.1.- Definición de la tosferina

La tosferina o coqueluche es una enfermedad mediada por toxinas (9), caracterizada por una traqueobronquitis aguda que afecta únicamente al género humano. Las manifestaciones clínicas, que dieron el nombre a la enfermedad, consisten en ataques de tos paroxística seguido de un típico estridor inspiratorio; esta sintomatología sólo puede observarse en pacientes no vacunados y sin tratamiento médico, en donde la enfermedad sigue su curso natural (2). En general,



se prefiere el término de pertussis, acuñado por Sydenham en 1679 (10), al de tosferina, pues en muchos lactantes enfermos falta el gallo o estridor inspiratorio característico (11-13). En este trabajo se utilizarán los dos términos indistintamente debido a la amplia aceptación y uso del vocablo tosferina. En China la enfermedad se conoce como " la tos de los 100 días" , en alusión a la duración del síntoma fundamental, la tos (10).

### 1.2.2.- Historia de la tosferina

La enfermedad fue reconocida por primera vez por Moulton y De Baillou, a mediados del siglo XVI (2,3). Ellos describieron una epidemia, que ocurrió en París en 1578, con las siguientes palabras:

*THE LUNG IS SO IRRITATED BY EVERY ATTEMPT TO EXPEL THAT WICH IS CAUSING THE TROUBLE IT NEITHER ADMITS THE AIR NOR AGAIN EASILY EXPELS IT. THE PATIENT IS SEEN TO SWELL UP AND AS IF STRANGLED HOLDS HIS BREATH TIGHTLY IN THE MIDDLE OF HIS THROAT....FOR THEY ARE WITHOUT THE TROUBLESOME COUGHING FOR THE SPACE OF FOUR O FIVE HOURS AT A TIME, THEN THIS PAROXYSM OF COUGHING RETURNS, NOW SO SEVERE THAT BLOOD IS EXPELLED WITH FORCE THROUGH THE NOSE AND THROUGH THE MOUTH. MOST FREQUENTLY AN UPSET STOMACH FOLLOWS...FOR WE HAVE SEEN SO MANY COUGHING IN SUCH MANNER, IN WHOM AFTER A VAIN ATTEMPT SEMIPUTRID MATTER IN AN INCREDIBLE QUANTITY WAS EJECTED.*

Como señala Olson, los parisinos de mitad del siglo XVI fueron testigos del nacimiento de una enfermedad previamente desconocida para el hombre (14).

En 1822, Benjamin Waterhouse escribió un extenso tratado sobre la ***"Tussis Convulsiva or Whooping-Cough"***, describiendo las tres fases de la enfermedad: catarral, paroxística y convaleciente. Excepto en la asunción de la falta de modificación en la difusión de la enfermedad por el tratamiento, todas las demás aseveraciones realizadas por Waterhouse se mantienen vigentes en la actualidad (15).

Cien año más tarde, en 1922, fue incluida como enfermedad de declaración obligatoria en Estados Unidos, teniendo, desde entonces, datos de la morbilidad y mortalidad ocasionadas por esta bacteria.

### 1.2.3.- La tosferina en la etapa postvacunal

La aparición de la vacuna contra la tosferina a finales de la década de los cuarenta en Estados Unidos y su progresiva distribución por el resto del mundo ha provocado un brusco descenso en la mortalidad de la enfermedad. El hecho de que, actualmente, no represente un problema serio en la salud, ha inducido a algunos autores a considerarla como una curiosidad médica o a afirmar que nadie se infecta después de los 12-15 años (14,16,17).

Contrariamente a lo que se podría desprender de tales afirmaciones y a poco que se revise la bibliografía actual especializada, rápidamente se será consciente de que la pertussis es un problema de salud, tanto en los niños como en los adultos, pendiente de resolución. Basta hacer una búsqueda bibliográfica para tomar conciencia de la inquietud creciente que esta enfermedad está produciendo y que ha dado origen a 738 artículos entre los años 1987-1992. Corroborando esta situación, se encuentra el editorial (Archivist) publicado por Archives of Disease in Childhood, en 1992 (18); el título del artículo es extremadamente sugerente de la vigencia que posee esta enfermedad: "**Pertussis, pertussis, pertussis**". En él se refiere que:

*"A pesar de las inmunizaciones, la tosferina se encuentra ampliamente difundida por el mundo, siendo los adultos una fuente importante de contagio. En éstos, la sintomatología es diferente a la observada en los niños no vacunados. Los adultos presentan una prolongada tos paroxística que empeora por la noche, constituyendo un criterio diagnóstico. El 86% de los adultos se quejan de respiración acortada durante el paroxismo y una sensación de hormigueo en la garganta. Menos del 10% de los adultos tienen vómitos o estridor después de la tos. Ninguno presenta cianosis, ni linfocitosis, siendo el aislamiento de la B. pertussis muy escaso. Observaciones similares se detectan en niños que presentan la enfermedad a pesar de estar inmunizados."*

Finalmente, se plantea la cuestión sobre la necesidad de revacunaciones contra la tosferina por encima de los siete años.

En el V Simposio Internacional sobre Pertussis, celebrado en Copenhagen en 1988, se recogieron las siguientes aseveraciones (19):

- Un niño menor de cinco años muere cada 52 segundos de pertussis en el mundo, o lo que es lo mismo, 606.000 niños menores de cinco años mueren en el mundo, cada año.
- En Estados Unidos la incidencia anual de pertussis aumentó de 0.82 por 100.000 habitantes en 1982 a 1.74 por 100.000 habitantes en 1986, pasando a representar los adolescentes y mayores de 20 años el 12% de los casos declarados, frente al 5% de 1982.

#### 1.2.4.- Papel del adulto en la perpetuación de la tosferina

Como se observará más detalladamente en el capítulo de resultados, la prevalencia y títulos de anticuerpos alcanzan unos niveles importantes en los adultos, reflejando la connivencia de este segmento poblacional con esta bacteria tan sumamente contagiosa. Pudiera tratarse de que, o bien después del calendario de vacunaciones, o bien tras padecer una tosferina, los individuos desarrollaran una inmunidad contra la enfermedad, pero no contra la infección. Ello no impediría que, pasado un cierto período de años, estos individuos se volvieran susceptibles a una nueva reinfección con este patógeno, con una tasa de ataque superior al 90% en los

contactos susceptibles (17,20,21). El resultado sería, si esta hipótesis se ratificara, la aparición de una sintomatología sumamente atípica, imputada a procesos banales, difícilmente atribuible a esta bacteria, con una evolución totalmente desapercibida y una perpetuación de la infección por la transmisión de un individuo a otro hasta el contacto con un individuo susceptible, en donde se expresaría el cuadro sugerente de una pertussis clásica.

La verdadera incidencia de la pertussis en el grupo de adultos y la relativa importancia de éstos como portadores y transmisores de la enfermedad son datos actualmente desconocidos y fuente de grandes controversias (22-33). Mientras que la transmisión adulto-adulto puede jugar algún papel en la perpetuación de la epidemia, la transmisión documentada de este tipo de vehiculación no está todavía clarificada. En un estudio, con una vigilancia epidemiológica muy intensa, llevada a cabo en un epidemia de tosferina ocurrida en Seattle-King County Washington, en 1984, se observó la transmisión entre adultos que trabajaban en la misma habitación, pero no se contagiaban los adultos de habitaciones contiguas, ni la enfermedad se extendía a los contactos del hogar, por lo que se sugería la presencia de algún otro mecanismo en esta transmisión adulto-adulto (34).

### 1.3.- Problemas diagnósticos de la tosferina

#### 1.3.1.- Problemas del diagnóstico clínico

El problema del diagnóstico clínico de la tosferina radica, entre otros motivos, en su posible y frecuente presentación Clínica atípica tanto en recién nacidos como en niños vacunados y adultos, pudiendo ser fácilmente diagnosticados de neumonía, bronquitis crónica, bronquiolitis, etc (11-13,30,35-40). Además, cuadros respiratorios provocados por agentes víricos pueden producir una sintomatología indistinguible de una pertussis (41-47).

Los síntomas que se asumían como característicos de la tosferina, tales como la tos paroxística, vómitos, picor de garganta, etc, a la luz de las nuevas herramientas diagnósticas, parecen no poseer el rendimiento diagnóstico que se les atribuyó. Pueden aparecer tardíamente, cuando las posibilidades de aislar la bacteria en los especímenes nasofaríngeos han disminuido marcadamente (3,24,36,48-53).

#### 1.3.2.- Problemas del diagnóstico bacteriológico

La enorme dificultad para el aislamiento de esta bacteria, agudizada en sujetos vacunados, provocó un editorial del CDC, en 1985, en donde se pone de manifiesto que la metodología corrientemente utilizada para el diagnóstico de pertussis parece inadecuada, impidiendo los estudios de transmisión de la tosferina (34).

A la dificultad en el aislamiento de la bacteria en los sujetos vacunados, hay que añadir lo extremadamente exigente que es *B. pertussis* en cuanto a sus condiciones de transporte, crecimiento, así como, el período de tiempo óptimo para la toma del espécimen, justo en un momento en que la sintomatología es indistinguible de cualquier proceso agudo de vías respiratorias superiores (3,10,13,15,17,35-37,40,48,50,54-60).

La carencia del estándar de oro de cualquier proceso infeccioso, el cultivo, ha dado lugar a la aceptación del diagnóstico clínico de tosferina como criterio válido para ser incluida en los boletines epidemiológicos en todos los países con registros epidemiológicos de la enfermedad.

Este diagnóstico clínico podría ser aceptable si estos cuadros estuvieran producidos únicamente por *B. pertussis* pero, desafortunadamente esto no es así, diagnosticándose de tosferina procesos respiratorios alérgicos, infecciosos provocados por adenovirus, enterovirus, virus respiratorio sincitial, parainfluenza, sarampión, paperas, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia* (11,41-47). Por el contrario, cuadros respiratorios atípicos, cuya única sintomatología sea la tos, pasan totalmente desapercibidos en cuanto al diagnóstico, provocando la expansión de la enfermedad y tratamientos innecesarios y costosos.

Resumiendo, estamos habitualmente incluyendo como tosferina a procesos respiratorios originados por otros agentes y dejando de incluir como tosferina cuadros atípicos provocados por esta bacteria.

#### 1.4.- Definición clínica de tosferina

En un intento de evitar estas confusiones diagnósticas, en 1990, el CDC define el caso clínico de pertussis como una tos de más de dos semanas de duración, acompañada de uno de los siguientes síntomas: paroxismo de la tos, estridor inspiratorio, vómitos después de la tos y ausencia de otra causa aparente que justifique esta sintomatología. Esta definición es apropiada para casos endémicos o esporádicos. En una epidemia, un caso puede ser definido como pertussis con la única existencia de una tos de más de dos semanas de duración. Un caso clínico se considera "Probable" si reúne los criterios de un caso-definición, pero no está confirmado por el laboratorio, o epidemiológicamente unido a un caso confirmado por el laboratorio. Un caso clínico se clasifica como "Confirmado" cuando está respaldado por el laboratorio o epidemiológicamente unido a un caso confirmado por el laboratorio (61). No obstante, como se discutirá más adelante, no existe una aceptación internacional generalizada en la aceptación de la duración de la tos para la definición de caso clínico (36,38,39,51,62-66).

#### 1.5.- Epidemiología de la tosferina

La epidemiología, básicamente, es una ciencia de cocientes en los cuales, por ejemplo, el numerador es el número de casos de una enfermedad que se producen en un período dado y el denominador es la población total con riesgo (67). Aquí, nada más comenzar, se encuentra la primera dificultad, el definir sin sesgo el numerador, hecho, que como se ha revisado anteriormente, encierra graves



problemas. No obstante, con estas salvedades, lo que si se puede observar es la tendencia de la enfermedad, que no de la infección, desde 1922 en Estados Unidos y posteriormente en los países con registros epidemiológicos.

La tosferina fue una de las mayores causas de mortalidad y morbilidad infantil en el mundo. Actualmente, no solamente es un importante problema en los países en vías de desarrollo, sino que también vuelve a ser problema en los países desarrollados, en parte por el abandono de los calendarios de inmunizaciones, en parte por la corta inmunidad conferida por la vacuna y, en parte, por la dificultad existente en el diagnóstico de la enfermedad, lo que origina importantes lagunas en su conocimiento, tales como: transmisión, reservorios, infecciones subclínicas, causa de la sintomatología, etc. Una exhaustiva revisión epidemiológica ha sido realizada en 1992 por Hodder and Mortimer (68).

No existe ninguna duda es en los cambios epidemiológicos introducidos con el uso de las vacunas. Los picos de incidencia de la enfermedad se han trasladado a edades más extremas, menores de un año y, a los adolescentes y adultos. Los brotes epidémicos que ocurrían cada 3-5 años, son difíciles de observar, quedando relegados a pequeñas comunidades. Lo mismo ocurre con las incidencias estacionales de la enfermedad, siendo muy variables de unos países a otros e incluso dentro de un mismo país, la afectación por sexos.(3,14,15,25,27,30,34,51,64,66,69-78).

### 1.6.- Incidencia de la tosferina

La incidencia de la tosferina a nivel mundial es desconocida, tanto en los países en vías de desarrollo, como en los países desarrollados. Este desconocimiento es la consecuencia de múltiples factores que actúan sobre la practicabilidad del control epidemiológico de la enfermedad, tales como la falta de programas de vigilancia, sintomatologías atípicas, ausencia de métodos diagnósticos sensibles y específico y las condiciones problemáticas del aislamiento de la bacteria.

#### 1.6.1.- Incidencia de tosferina en Estados Unidos

En 1922 fue incluida como enfermedad de declaración obligatoria en Estados Unidos. La máxima incidencia de la enfermedad ocurrió en 1934 con una morbilidad de 265.269 casos declarados y una mortalidad de 7.518 sujetos. La máxima mortalidad se observó en 1923 con 9.269 niños. (71,79)

La introducción de la vacuna en Estados Unidos a finales de la década de los cuarenta provocó una drástica disminución de la enfermedad en este país, pasando de 109.1 casos por 100.000 habitantes en el período entre 1943-1945, a unas tasas por 100.000 habitantes, de 33.5 en el período 1953-1955 y de 0.54 en 1981. No obstante, a partir de 1980 se viene observando un aumento gradual en la incidencia de esta enfermedad (20,39,66,71,78-83) no sabiéndose, aún con certeza, si este incremento es debido a un verdadero aumento de la tosferina o a una mayor notificación de los casos al Centers for Disease Control, aunque se sospecha que

se declaran entre un 2.7% y un 10% de los casos de pertussis (39,84,85). Así pues, las infecciones por *B. pertussis*, no solamente representa un problema de salud en los países en vías de desarrollo, sino que también es un problema de salud re-emergente en los países desarrollados.

#### 1.6.2.- Incidencia de tosferina en España

En lo que respecta a España, poseemos datos de tosferina desde 1982, fecha en la que se incluyó entre las enfermedades de declaración obligatoria. En el Boletín Epidemiológico correspondiente a la semana 7 de 1986 (86) se reconoce que la tosferina continúa siendo una enfermedad ampliamente difundida en nuestro país, a pesar de la escasez de datos disponibles y de la brevedad de la serie de años recogida. Se señala el aumento de casos declarados en los años 1982 y 1985, haciendo compatible este hecho con la evolución secular en ondas epidémicas de la tosferina, debidas al aumento de niños susceptibles de forma periódica, siendo dicha periodicidad variable de un país a otro. En la tabla 1.1 se encuentran representados los datos correspondientes a casos y tasas de tosferina en España desde 1982 a 1991, ambos inclusive. En esta tabla se puede observar que son los años 1982, 1985 y 1986 los que contienen un mayor número de casos declarados, pudiendo coexistir otras variables para explicar la mayor incidencia de esta enfermedad durante estos años, además de la evolución secular de la tosferina.

### 1.6.3.- Incidencia de tosferina en la Comunidad de Madrid

En lo referente a la Comunidad de Madrid, poseemos cifras de los casos de tosferina desde 1986 y por Áreas Sanitarias desde 1987. En la tabla 1.1 se exponen los datos extraídos de los boletines epidemiológicos semanales editados por el Ministerio de Sanidad y Consumo, Dirección General de Salud Pública, desde 1986, y de los boletines epidemiológicos del Servicio Regional de Salud de la Comunidad de Madrid, Consejería de Salud, desde 1987 (87). Es muy probable que la mayoría de estos casos de tosferina hayan sido diagnosticados solo desde un punto de vista clínico, sin confirmación bacteriológica, como se recoge en un Avance Epidemiológico Semanal de 1991, editado por el Servicio Regional de Salud de la Comunidad de Madrid (88).

Tabla 1.1. Tasas de tosferina en España por 100.000 habitantes.

AÑO	NACIONAL	MADRID	AREA 10
1982	133,38		
1983	91,42		
1984	92,42		
1985	153,9		
1986	140,5	200,02	
1987	67,15	96,41	2,07
1988	35,77	51,14	25,2
1989	81,09	92,33	41,8
1990	24,35	28,34	18,2
1991	21,44	21,72	16,84

### 1.7.- Historia de *Bordetella pertussis*

En 1900, Bordet y Gengou observaron, en una niña de cinco meses previamente sana, una zona blanquecina, no mezclada con saliva, en el exudado expulsado con un ataque de tos. La coloración de esta zona blanquecina con el azul fenicado de Kühne reveló multitud de leucocitos y una enorme cantidad de pequeñas bacterias ovoides, algunas más elongadas y otras más cortas, coloreadas en azul pálido. La atención y la paciencia consagrada por estos autores en la investigación de las técnicas de aislamiento dio su fruto seis años después, en 1906, con el aislamiento de esta bacteria en un medio elaborado por ellos y que ha conservando su vigencia hasta la actualidad.(89).

Tuvieron que pasar varios años antes que el bacilo de Bordet-Gengou fuera admitido como el agente causal de la tosferina (14).

Los organismos incluidos en el género *Bordetella* son: *B. pertussis* aislada por Bordet y Gengou en 1906; *B. bronchiseptica* aislada por Ferry en 1911 en las vías respiratorias de perros que padecían "distemper" por lo que, primeramente, fue denominada *Bacillus bronchicanis*. En 1912, Ferry encontró el mismo bacilo en cobayas, conejos y monos, por lo que cambió su nombre a *Bacillus bronchisepticus*. El tercer miembro de este género es *B. parapertussis* identificada por Eldering y Kendrick en 1938 en enfermos con tosferina. A diferencia de *B. pertussis*, su aislamiento y crecimiento puede llevarse a cabo en medios comunes (90-93).

En un principio, todas las especies de bordetelas fueron incluidas por Williams, en 1914, (14) en el género *Haemophilus*, de la familia de las *Brucellaceas*, debido a:

- sus similitudes antigénicas y morfológicas por microscopía óptica;
- el requerimiento de un medio conteniendo sangre para el aislamiento de *B. pertussis*;
- y a las patologías observadas en cobayas, conejos y cachorros de perros, muy parecidas a las ocasionadas por las brucelas.

Pronto se vio que se diferenciaban claramente de las especies del género *Haemophilus* porque, tanto *B. pertussis*, como las otras dos especies hasta entonces descubiertas, no necesitaban los factores de crecimiento X (hemina) y V (dinucleótido de nicotinamida adenina, NAD) para su desarrollo. Asimismo, no pudo encontrarse una relación antigénica entre las especies del género *Haemophilus* y las distintas especies de bordetelas. Las necesidades de sangre de estas últimas para su aislamiento no tenían una finalidad nutritiva, sino neutralizantes de materiales tóxicos desconocidos (quizá ácidos grasos), producidos durante su crecimiento, (tabla 1.2). Los medios de crecimientos líquidos o sólidos conteniendo carbón, albúmina, almidones o resinas de intercambio aniónico, en lugar de la sangre, son completamente satisfactorios para los aislamientos de bordetelas (90-92).

Tabla 1.2. Diferencias entre los géneros *Bordetella*, *Brucella*, *Haemophilus*

Características	<i>Bordetella</i>	<i>Brucella</i>	<i>Haemophilus</i>
Parásito estricto	+	+	+
Localización cilios respiratorios.	+	-	-
Aerobio estricto	+	+	-
Crecimiento tiamina	-	+	-
Crecimien. nicotinamida	+	-	-
Factor V y/o X	-	-	+
Fermenta carbohidratos	-	-	+
Reducción nitratos	+/-	+	+
Oxidación aminoácidos	+	+	-
Mol% Guanidina/citosina	66-70	55-58	38-44

Posteriormente fue aceptada la propuesta de Moreno López para la creación de un nuevo género, el "*Género Bordetlla*". El término *Bordetlla* fue modificado por Eldering y Lawson acuñando el nombre de *Bordetella*, término aceptado por Bordet, padre e hijo, el 10 de septiembre de 1952 figurando en el Manual Bergey desde 1953 (93-95).

### 1.7.1.- Biología del género *Bordetella*

La relación entre las especies de *Bordetella* se han enfocado de distintas formas. Una de las características del género *Bordetella* es la alta relación Guanidina/citosina (66 a 70%) que posee su DNA. La gran homología existente en sus bases nucleótidas indujo a Kloos y col., en 1978, a que se cuestionaran la existencia de estas tres especies como entidades separadas dentro de este género. Investigaciones posteriores demostraron una estrecha relación genética por reasociación del DNA. El DNA marcado de *B. pertussis* se hibridaba con el DNA de *B. parapertussis* en un 88-94%; la homología compartida con *B. bronchiseptica* oscilaba entre el 72 y el 93%. (96).

Estudios posteriores de Musser y col. sobre genética molecular sugieren que los tres organismos presentan insuficientes diferencias para ser clasificados como especies diferentes. Análisis electroforéticos, realizados sobre enzimas no relacionadas con la virulencia, han demostrado una estrecha relación entre las tres especies. Estos autores concluyen que *B. parapertussis* está más relacionada con *B. bronchiseptica* que con *B. pertussis* (97). Marchitto y col. apuntan las mismas conclusiones estudiando la homología de la secuencia de nucleótidos del gen codificador de la toxina pertussis (98).

Aunque los tres organismos poseen la información genética para la elaboración de la Toxina Pertussis, principal factor determinante de la virulencia de



la enfermedad, únicamente *B. pertussis* produce esta toxina. La aportación exógena de los genes codificadores de toxinas de *B. pertussis* a *B. parapertussis* induce a esta última a la producción de dicha sustancia. Esto parece indicar que la diferencia entre las dos especies reside en la regulación de los genes codificadores de toxinas (99). Un dato a favor de esta sugerencia es la aportación de algunos trabajos en donde se recoge la inducción de la interconversión de *B. pertussis* en *B. parapertussis* (100). Si *B. parapertussis* fuera una cepa no toxigénica de *B. pertussis*, explicaría ciertas observaciones enigmáticas sobre el papel de *B. parapertussis* en el desarrollo de la enfermedad. Se han comunicado infecciones conjuntas de las dos bacterias, aislándose *B. parapertussis* en individuos con una pertussis e importante linfocitosis (el factor promotor de la linfocitosis, o toxina pertussis, es una toxina producida exclusivamente por *B. pertussis*) (101). Otros autores van incluso más lejos, indicando la conversión de *B. pertussis* en *B. parapertussis* (7), o señalando que no es preciso identificar la especie de bordetela aislada, ya que *B. parapertussis* sería una variante de *B. pertussis* que aparecería como resultado de una presión selectiva para evadir la respuesta de inmunidad humoral del huésped contra la bacteria (102,103).

Hasta ahora, poca atención se le ha dedicado a *B. bronchiseptica* como agente patógeno en humanos (104). En los últimos años, se está experimentando un mayor interés por el estudio de esta especie de bordetela en los sujetos inmunocomprometidos (trasplantados, síndrome de Down, Sida, etc) en donde origina cuadros respiratorios de vías bajas y incluso septicemias. Woolfrey y Moody han realizado una magnífica revisión sobre el tema en 1991, registrando 25

infecciones, hasta la fecha, en la literatura (105). Desde 1991 hasta la actualidad se están produciendo nuevos aislamientos en sujetos inmunocomprometidos, sobre todo en pacientes con HIV positivo (106-110).

En 1984, Kersters y col. (111) describieron un cuarto miembro del género *Bordetella* como causante de enfermedades respiratorias en las aves. A este cuarto miembro, Kersters y col. le han denominado *B. avium*. *B. avium* es muy semejante a *B. bronchiseptica* (previamente fue considerada especie *Alcaligenes*) (10), originando una coriza en los pavos. Hasta nuestros días, no se ha descrito ninguna patología causada por esta bacteria en el hombre (3,10).

En el Manual Bergey de 1984 (93) se la denomina *B. bronchiseptica like-bacterium* por su parecido a *B. bronchiseptica* en la patogénesis respiratoria, lesiones patológicas, epidemiología y por tener el antígeno O común. Las diferencias entre las dos especies residen en que *B. avium* es:

- ureasa negativa,
- oxidasa positiva después de 48-72 horas de incubación,
- producir la reducción de nitratos únicamente cuando el medio está suplementado con 100 µg de NAD por mililitro y suero al 1%,
- la relación de Guanidina/citosina es más baja de la encontrada en las otras especies de este género (61.6%).

En el Manual Bergey se recomienda, de momento, no incluir esta bacteria en el género *Bordetella* hasta que su posición taxonómica pueda ser mejor valorada (93). Sin embargo, hay que tener en cuenta la larga periodicidad con la que se efectúa la revisión de este manual. Por otro lado, para que una nueva bacteria sea incluida o modificada taxonómicamente en el "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", ésta

debe aparecer previamente en revistas especializadas sobre clasificaciones y nuevas taxonomías, tales como: International Journal of Systematic Bacteriology, Current Microbiology, Journal of Clinical Microbiology, Systematic and Applied Microbiology, y últimamente, Clinical Infectious Diseases. *B. avium* ha sido reconocida como tal en el International Journal of Systematic Microbiology y en Clinical Infectious Diseases (111,112).

#### 1.7.2.- Propiedades del género *Bordetella*

Los cuatro miembros de este género son cocobacilos capsulados, de 0.2-0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro por 0.5-2.0  $\mu\text{m}$  de longitud, ordenados en pares o solitarios, rara vez en cadenas y, frecuentemente, con una morfología pleomórfica. Estructuras filamentosas parecidas a los pili rodean toda la superficie de los cuatro miembros del género. Son bacterias Gram negativas, aerobias estrictas, ovoides, inmóviles (excepto *B. bronchiseptica* y *B. avium* que poseen flagelos peritricos que les proporcionan movilidad), no formadoras de esporas y con grandes dificultades para su crecimiento in vitro. Su replicación es lenta, aún en condiciones óptimas, requiriendo que el medio de cultivo contenga nicotinamida, restos sulfurosos orgánicos como la cisteína y nitrógeno orgánico en forma de aminoácidos. Su crecimiento puede estar inhibido por factores que se hallan presentes en los procedimientos bacteriológicos rutinarios y/o por productos elaborados por la propia bacteria (ácidos grasos insaturados, residuos sulfurosos, toxinas, etc). El medio de agar sangre con almidón de patata y glicerol, usado comúnmente por Bordet y

Gengou, sirve primariamente como absorbente, pudiendo ser reemplazado por otras sustancias como el carbón vegetal, resinas de intercambio aniónico, etc.

De sus propiedades químicas destaca la no fermentación de azúcares como la glucosa, levulosa, galactosa, maltosa, sucrosa, dextrinas, manitol, lactosa e inulina. La producción de una discreta zona de hemólisis en medios con sangre. Las principales diferencias entre las especies residen en la capacidad de producción de ureasa, catalasa, coagulasa y reducción de nitratos. *B. pertussis* es coagulasa y catalasa positiva, dependiendo de las cepas. *B. paraptussis*, además de coagulasa positiva, es ureasa positiva y la positividad de la catalasa es mucho más intensa que en *B. pertussis*. *B. bronchiseptica* es catalasa, coagulasa y ureasa positiva, produciendo la reducción de nitratos a nitritos (tabla 1.3) (3,10,14,16,89-91,93,113).

Tabla 1.3. Características del género *Bordetella*

Características	<i>B.pertussis</i>	<i>B.parapertussis</i>	<i>B.bronchiseptica</i>	<i>B.avium</i>
Movilidad	-	-	+	+
Crecimiento	3-6 días	1-2 días	1-2 días	1-2 días
Aerobio estricto	+	+	+	+
Carbohidratos	-	-	-	-
Citrato	-	+	+	+
Nitratos	-	-	+a	+b
Ureasa	-	+	+c	-
Oxidasa	+	-	+	+d
Coagulasa	+/-	+	+	-
Catalasa	+/-	+	+	-
Peroxidasa	+	+	+	-
Actividad adenilato ciclasa	Extracel. +	+	+	-
Intracel. +		-	-	
Gelatina	-	-	-	-
Nicotinamida	+	+	+	-
SH.orgánico	+	+	+	-
N.orgánico	+	+	+	-
Inhibición crecimiento AGNS	+	-	-	-

- a. Regularmente positiva en medio de nitrato suplementado con NAD y suero. Excepciones ocurre en medio de nitrato convencional.
- b. Sólo en medio suplementado con NAD y suero.
- c. Positivo en 4 horas.
- d. Test de Kovacs positivo después de 48-72 horas de incubación.

AGNS: Ácidos grasos no saturados.

### 1.8.- Características clínicas de la tosferina

*B. pertussis* es un patógeno estrictamente humano multiplicándose exclusivamente en los cilios de las células epiteliales respiratorias.

La enfermedad comienza, después de un período de incubación que oscila entre 7 y 20 días, con una sintomatología catarral totalmente indistinguible de cualquier proceso infeccioso de vías respiratorias superiores. Es en este período catarral, con una duración entre 1 y 2 semanas, cuando la enfermedad es más contagiosa y el éxito del aislamiento de la bacteria es mayor (36,50,89,114-120). Sin embargo, debido a la naturaleza tan inespecífica de la sintomatología no se suele pensar en la pertussis a no ser que esté en curso una epidemia.

Pasada esta fase catarral comienza la fase paroxística con ataques de tos, predominantemente nocturnos al principio, que posteriormente se van extendiendo a lo largo del día produciéndose de 15 a 25 ataques de tos paroxística. Estos ataques severos de tos acaban expulsando el moco que obstruía las vías aéreas y

originando un típico estridor inspiratorio o gallo al paso del aire por una glotis inflamada. La ausencia de este estridor en lactantes menores de seis meses, niños vacunados y adultos ha dado lugar a preferir el término pertussis al de tosferina. Un gran número de niños presentan vómitos al finalizar estos ataques. El aumento de presión venosa puede ocasionar epístaxis, petequias, hemorragias conjuntivales, melenas, hematomas subdurales o epidurales. El aumento de presión también puede causar hernias umbilicales o inguinales, prolapso rectal, neumotórax, enfisemas subcutáneos o mediastínicos (3,10,14,53,89,91).

Al contrario de lo que ocurre en otras infecciones bacterianas, esta enfermedad suele cursar afebril o con unas pocas décimas. La presencia de fiebre sugiere la existencia de una segunda infección sobreañadida (10).

En esta fase aguda de la enfermedad, no está claro si el uso de los antibióticos detiene el curso de la pertussis pero parece ser útil para impedir la difusión de la misma (21,46,52,69,121-127). Algunos autores recomiendan su uso empírico ante cualquier cuadro altamente sospechoso de tosferina, ya que la eritromicina es también efectiva contra la neumonía causada por *Mycoplasma pneumoniae*, la cual suele presentar la tos como síntoma prominente (26). Otros autores, sin embargo, dudan de la efectividad de la eritromicina en la profilaxis de la tosferina (29) y, en algunos países como Suecia, la recomendación oficial es la no administración de eritromicina en el tratamiento de la pertussis no complicada en niños mayores de un año, ni en contacto con más de seis meses de edad (128). En



esta misma fase, cuando la sintomatología es más intensa, es extremadamente difícil el aislamiento de la bacteria en estos pacientes (17,129).

Transcurrido el período de 1 a 4 semanas que dura la fase paroxística, los ataques de tos empiezan a ser menos severos y más espaciados en el tiempo pudiendo persistir más de seis meses. Los ataques de tos paroxística pueden volver a recrudecerse si se sobreañade otro proceso infeccioso respiratorio. En esta fase convalecencia es prácticamente imposible encontrar el organismo en la nasofaringe de los individuos infectados.

Aunque el cuadro típico de tosferina únicamente se puede observar en niños no vacunados, no todos estos niños presentan el cuadro clínico clásico, sobre todo los menores de seis meses y, especialmente, los de menos de tres meses de edad. De los 5865 casos recogidos en Estados Unidos entre 1984 y 1985, el 37% de los casos ocurrieron en menores de seis meses y solamente la mitad de éstos presentaron el típico estridor laríngeo o gallo (78).

Los estadios clínicos de la infección así como sus complicaciones pueden analizarse en términos de interacción entre *B. pertussis* y el huésped.

#### 1.8.1.- Transmisión de la tosferina

La transmisión de la infección entre los individuos ocurre, presumiblemente, por secreciones respiratorias vehiculizadas por el aire desde un paciente con

pertussis a las vías respiratorias de un individuo susceptible. También es posible que las secreciones respiratorias del individuo enfermo contaminen los objetos que se encuentran en el medio ambiente y que el individuo susceptible, a través de sus manos, transporte la bacteria a sus vías respiratorias (3.10).

#### 1.8.2.- Patogenia de la tosferina

En la patogénesis de la pertussis, los siguientes cuatro pasos son importantes:

- A) Anidamiento a los cilios de las células epiteliales de la mucosa respiratoria.
- B) Evasión de las defensas del huésped.
- C) Producción del daño local.
- D) La enfermedad sistémica.

##### 1.8.2.1.- Anidamiento en la mucosa respiratoria

Para la unión a los cilios de las células respiratorias, la hemaglutinina filamentosas y el factor promotor de la linfocitos juegan un papel importantísimo, no estando claro el papel desempeñado por los aglutinógenos y la fimbria (130-133). Weiss y Hewlett (117) afirman que otros factores, además de la hemaglutinina y el factor promotor de la linfocitosis, son necesarios para que se produzca la anidación de las bacterias.

#### 1.8.2.2.- Evasión de los mecanismos de defensa del huésped

La evasión de la respuesta inmunológica la lleva a cabo *B. pertussis* mediante la producción de adenilato-ciclasa (posee un efecto deletéreo sobre las células que intervienen en los mecanismos de defensa) y la citotoxina traqueal (alterando los mecanismos normales de limpieza de las vías respiratorias), lo que permite la persistencia del foco infeccioso (117).

#### 1.8.2.3.- Producción del daño local

A partir de estudios realizados en animales de experimentación, el daño local parece derivarse de la producción de citotoxina traqueal, toxina dermonecrótica, adenilciclasa y hemolisinas (3,117,134).

#### 1.8.2.4.- La enfermedad sistémica

El anidamiento de las bacterias en los cilios del tracto respiratorio, su multiplicación in situ evadiendo las defensas del huésped y no pasando al torrente sanguíneo, y la producción de toxinas va a dar lugar a la cuarta fase de la patogénesis de la enfermedad: la enfermedad sistémica. De los factores con actividad biológica producidos por *B. pertussis*, únicamente la toxina pertussis y , quizá, los lipopolisacáridos, originan efectos sistémicos en los animales de experimentación, sobre todo, la toxina pertussis (9,135). Sin embargo, los efectos sistémicos sobre los humanos no están bien definidos y algunos síntomas como la

pérdida de peso y la hipoglucemia, anteriormente atribuidos a las toxinas, pudieran ser debidos al estado nutritivo de los sujetos afectados de tosferina. Lo mismo podría decirse de las hipoglucemias observadas en estos sujetos. La única manifestación sistémica que claramente puede atribuirse a la toxina pertussis es la linfocitosis .

La complicación clínicamente más importante de la infección por *B. pertussis* es la encefalopatía. En 1956 Miller y col. (3) hicieron una exhaustiva revisión de las encefalomiELITIS parainfecciosas, llegando a la conclusión que las complicaciones neurológicas de la pertussis difieren, clínica y patológicamente, de las complicaciones neurológicas del sarampión, varicela, rubeola y paperas. Aunque la literatura anterior a esta época contenían muchas referencias sugiriendo una encefalitis tosferinosa, los hallazgos patológicos en la mayoría de los casos, una vez excluidas otras etiologías, fueron de naturaleza no inflamatoria.

Los hallazgos encontrados en cerebros examinados a simple vista fueron edema y alguna hemorragia ocasional. En otros pacientes no se observó ningún hallazgo anatomopatológico. Las meninges estaban frecuentemente edematosas y las lesiones del cerebro se localizaban en los hemisferios siendo de naturaleza vascular o degenerativa. Podían existir pequeñas hemorragias subaracnoideas pero las hemorragias importantes fueron raras. Los cambios observados eran consistentes con un daño cerebral secundario a la anoxia. Las lesiones desmielinizantes no eran características de esta encefalopatía, lo mismo que la pleocitosis.

Hasta la actualidad, la causa de la encefalopatía de la pertussis es desconocida. En la mayoría de los casos la explicación es una anoxia secundaria a los ataques de tos paroxística, no descartándose algunos casos que puedan ser atribuidos a la toxina pertussis o a la adenilciclase (136). Estas toxinas presentan las características generales y la estructura molecular de otras exotoxinas bacterianas, tales como la difteria y el cólera (137). Las actividades de las toxinas pertussis son mediadas por alteraciones enzimáticas de las funciones fisiológicas de ciertas células, sin alteraciones histológicas de las mismas.

#### 1.9.- Factores producidos por el género *Bordetella*

Las bacterias integrantes de este género producen una serie de sustancias con actividad biológica y capacidad de provocar una respuesta inmunológica, aunque no todas las especies producen los mismos factores. Así, el principal factor patogenético, el factor promotor de la linfocitosis o toxina pertussis, únicamente es elaborado por *B. pertussis*. A continuación se describirán las estructuras, funciones y capacidades antigénicas de las distintas sustancias producidas por el género *bordetella*.

##### 1.9.1.- Hemaglutinina filamentosa (FHA) y fimbria

La FHA es una proteína cilíndrica de superficie de 2 por 40-100 nm, con un peso molecular de 1.000 kDa determinado por filtración en gel a pH 8. En la electroforesis sobre gel de poliacrilamida con sodio dodecilsulfato se observan tres

componentes correspondientes a los pesos moleculares de 100, 130 y 220 kDa, estando asociada la capacidad hemaglutinante con el componente de 130 kDa. (138,139). Estudios posteriores de Thomas y col., en electroforesis sobre PAGE con sodio dodecilsulfato, refieren cuatro componentes con pesos moleculares de 92, 108, 114 y 136 kDa (140).

Su nombre se deriva de la capacidad que tiene esta proteína de aglutinar una gran variedad de hematíes de distintos animales, estando dicha capacidad inhibida por concentraciones micromoleculares de colesterol. Parece estar involucrada en la adherencia de *B. pertussis* al epitelio respiratorio ciliado, careciendo de actividad tóxica.

La abreviación FHA fue utilizada en un principio para referirse a la fimbriae ya que se pensó que la FHA era una proteína de la misma, basándose en las observaciones realizadas con microscopía electrónica sobre la unión de un suero de conejo anti FHA con la fimbria. Posteriormente, Ashworth (141) no encontró una correlación entre la capacidad aglutinante y las cantidades de fimbriae presente en las bacterias de la cepa Tohama I (aglutinógeno serotipos 1,2,4); además, utilizando un anticuerpo marcado dirigido contra la FHA no detectó reacción con las estructuras fimbriales. Sí se marcaban estas estructuras cuando el suero marcado estaba dirigido contra el serotipo 2, por lo que pensó que el anticuerpo utilizado por Sato contra la FHA podía estar contaminado con anticuerpos contra el aglutinógeno 2 de la fimbriae. La naturaleza distinta de la FHA y el serotipo 2 de la fimbria es evidente si se comparan las distintas propiedades de las proteínas purificadas. La fimbria o pilis

no es hemaglutinante, tiene una estructura filamentosa más larga y antigénicamente distinta a la FHA. Está formada por dos subunidades idénticas de 22 kD con ordenación helicoidal, en sus estructuras residen algunos de los epitopos que dan lugar a los diversos serotipos. Están aun en duda su papel de adhesina sobre las células ciliadas (9,142). Las cepas que contienen la fimbria tipo 2, pero que son deficientes en FHA, se adhieren débilmente a las células humanas WiDr, y a los cilios de las células epiteliales respiratorias. Las cepas mutantes deficientes en fimbria pero con FHA se adhieren eficientemente a los cilios de células humanas (131).

En resumen, los datos disponibles en la actualidad indican la distinta naturaleza de las dos proteínas, fimbria y FHA. Dos tipos de fimbria, aglutinógenos serotipos 2 y 6, han sido aislados de *B. pertussis*, no conociéndose cuántos diferentes tipos antigénicos fimbriales posee esta bacteria. Se está por determinar si el serotipo 6 es equivalente al serotipo 3 aislado por Irons et al.(138). También es especulativo el papel que juegan los pilis o fimbriae en la adherencia a los cilios. Su función estaría en promover un contacto inicial de la bacteria con los cilios para favorecer el posicionamiento de ésta con la porción apical del cilio (130).

La FHA junto con la toxina pertussis son los dos componentes fundamentales en la patogénesis de la enfermedad y de la respuesta inmunológica humoral a la misma. La FHA es fundamental para el Anidamiento de la bacteria en los cilios de las células epiteliales del árbol respiratorio, perdiéndose esta capacidad en cepas carentes de FHA o toxina pertussis. Estos dos antígenos se encuentran en la superficie bacteriana; actúan como adhesinas uniéndose a los restos galactosa-N-acetilglucosamina de los cilios (118,131,143).

#### 1.9.2.- Factor promotor de la linfocitosis o toxina pertussis

Previamente conocida por una gran variedad de nombres, dependiendo de la función estudiada, tales como:

- factor promotor de la linfocitosis (LPF),
- toxina promotora de la linfocitosis (LPT),
- factor hemaglutinante promotor de la linfocitosis (LPF-HA),



- factor promotor de la leucocitosis (LPF),
- factor sensibilizador a la histamina (HSF),
- proteína activadora de islotes (IAP),
- factor termolábil adyuvante de pertussis (HLAd) y
- toxina pertussis (PT)

Actualmente es reconocida como un único complejo proteico responsable de estos y otros efectos biológicos. Algunos autores prefieren denominarla LPF para evitar confusiones con la toxina dermonecrótica a la que originalmente se denominó toxina pertussis y porque, además, *B. pertussis* produce otras toxinas importantes (3).

La LPF es una proteína de membrana, antigénica y con capacidad hemaglutinante. Pertenece a la familia de las toxinas bacterianas que poseen actividad ADP ribosiltransferasa. Su sustrato lo constituyen las proteínas unidas a nucleótidos de guanina transductoras de los estímulos externos en las células de los mamíferos (3,10,90,118).

La exotoxina, perteneciente al modelo conformacional A/B de las toxinas bacterianas y con un peso molecular de 117 kDa, está compuesta por cinco subunidades denominadas S1 a S5 en una relación molecular de 1:1:1:2:1. . Las subunidades S2-S5, con pesos moleculares inferiores a 23 kDa, participan en la adhesión de la bacteria a los cilios de las células epiteliales respiratorias (3,4,6,10,90,137,140,144). La actividad tóxica, mediadora de la mayor parte de la sintomatología producida por la infección, reside en la subunidad S1 con peso

molecular de 28 kDa. Esta subunidad cataliza la transferencia del ADP-ribosa desde el NAD a la proteína unida al nucleótido de guanina, inactivando las proteínas G. Esto da lugar a una potenciación de los agonistas de la adenil ciclasa y a una inhibición de los antagonistas de la misma, con un resultado neto de aumento del AMP cíclico, importante mediador funcional en las células eucarióticas. Las alteraciones de los niveles intracelulares del AMP cíclico explican algunos de los efectos de la toxina pertussis tales como: aumento de la secreción de insulina por las células de los islotes pancreáticos, aumento de la sensibilidad a la histamina, inmunomodulación, etc. Otros mediadores intracelulares son también alterados por esta toxina (producción de ácido araquidónico, prostaglandinas, leucotrienos y fosfoinositoles; niveles intracelulares de calcio, etc) (3,10,118,145). Las múltiples consecuencias desencadenadas por esta toxina, junto con su papel primordial en la adhesión celular, ha inducido a Pittman a proponer que la pertussis es una enfermedad mediada por la toxina pertussis (9)

Cantidades tan pequeñas como de 0.02 microgramos producen una intensa linfocitosis en el ratón al cabo de unas pocas horas, alcanzándose la máxima linfocitosis entre los 3 y 5 días después de la administración. Esta linfocitosis representa alrededor del 60% de los leucocitos circulantes (146). En el niño parece originar el mismo efecto. Morse cree que esta linfocitosis es originada por una reducción en el "homing" de los linfocitos circulantes (147).

### 1.9.3.- Citotoxina traqueal

La evidencia de que una toxina pudiera ser la responsable del daño observado en las células epiteliales respiratorias fue señalada por Goldman en la Reunión Anual de la Sociedad Americana de Microbiología en 1980 (148). Cuando los anillos traqueales del hamster fueron expuestos a un concentrado del sobrenadante de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento de *B. pertussis*, se producía una destrucción de las células ciliadas, sin afectación de otros tipos celulares carentes de cilios. La exposición al sobrenadante causa una inhibición, dosis-dependiente, de la síntesis de DNA en las células traqueales, conservándose la síntesis de RNA y proteínas. Esto origina una falta de regeneración de las células ciliadas a partir de la división y diferenciación de las células basales. El curso clínico de la enfermedad sigue sin cambios aunque se hayan administrado antibióticos al comienzo de la tos paroxística y los organismos hayan sido eliminados. Esto sugiere efectos a largo plazo ocasionados por la toxina.

Mediante la purificación por ultrafiltración, filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico se aísla una proteína con peso molecular inferior a los 1800 daltons, distinta de las toxinas previamente identificadas por su actividad biológica. A esta toxina se la denomina citotoxina traqueal, debido a su actividad biológica, siendo sintetizada tanto por las cepas virulentas como por las avirulentas. Su estructura recuerda a los peptidoglicanos de las bacterias Gram negativas, formando parte de su composición el ácido murámico y el ácido diaminopimélico, compuestos

que sólo se encuentran en los peptidoglicanos. Alanina, ácido glutámico y glucosamina son otros componentes típicos de las Gram negativas (3,10,118,149).

#### 1.9.4.- Adenilato-ciclase

Es una enzima extracitoplasmática que *B. pertussis* libera al exterior durante su crecimiento, pudiendo ser detectada en los medios de cultivos (3).

Desde hace tiempo se conoce el mecanismo de inducción de la secreción por la toxina del cólera en el tracto intestinal, mediante la producción de un incremento en la actividad del AMP cíclico. Un síntoma característico de la tosferina es el aumento de la secreción de moco en los bronquios, lo que originó la búsqueda de una enzima producida por *B. pertussis* que potenciara el AMP cíclico de las células eucarióticas. Cuando la enzima se caracterizó y se estudió su localización en la bacteria, se observó que el 90% de su actividad residía fuera de la membrana citoplasmática: 20% estaba en el sobrenadante del medio de cultivo y el otro 70% restante se localizaba en la superficie celular, ya que su actividad se destruía tratando a la bacteria con tripsina. Esta enzima parece necesitar de un cofactor para obtener su máxima actividad, que ha sido identificado con la calmodulina propio de las células eucarióticas y del que parece carecer las bacterias.

Es una proteína relativamente termoestable, de 70.000 daltons, que puede existir, al menos, en dos formas.. Una, llamada enzima adenilato-ciclase, que sólo tiene actividad enzimática in vitro. La segunda forma que, además de tener la

actividad anteriormente descrita, tiene la capacidad de entrar en las células de los mamíferos y cataliza la reacción utilizando los almacenamientos celulares de ATP; es la denominada toxina adenilato-ciclasa (150).

La adenilato-ciclasa puede actuar como un factor de virulencia en la tosferina interfiriendo las funciones de las células fagocitarias del huésped. Una vez en el interior de las células fagocitarias es activada por la calmodulina y cataliza la formación de AMP cíclico que tiene un efecto adverso sobre la función fagocitaria. Este efecto sobre la fagocitosis permite al organismo sobrevivir en el lugar de la infección (117,134).

Algunas vacunas celulares de pertussis contienen cantidades significativas de adenilato ciclasa, siendo sus efectos desconocido en los vacunados (151)

#### 1.9.5.- Aglutinógenos

Son antígenos proteicos que se encuentran en la superficie de bordetelas sp. y que estimulan la producción de anticuerpos. El contacto de los anticuerpos con estos antígenos proteicos o aglutinógenos de bordetelas ocasionan la aglutinación de las bacterias, hecho que se utiliza para el serotipaje de las especies del género. Todas las cepas lisas de bordetela tienen en común un antígeno termoestable denominado antígeno O y uno o más antígenos termolábiles denominados antígenos K o aglutinógenos. De los 14 tipos de aglutinógenos del esquema de Eldering, el tipo 7 es común para todas bordetelas sp (3).

*B. pertussis* tiene el aglutinógeno tipo 1, pudiendo tener, también, los aglutinógenos 2 a 6 en diversas combinaciones, así como el aglutinógeno 13; éste último se puede encontrar en algunas cepas de las otras especies. Los aglutinógenos 2 y 4 y el tipo 3 y 6 suelen estar juntos (118).

El factor 14 es específico de *B. parapertussis*, al igual que el factor 12 es específico de *B. bronchiseptica* (tabla 1.4) (14).

Al considerar las implicaciones epidemiológicas de la distribución de los isotipos, es importante tener presente la capacidad que tienen estos microorganismos para cambiar de serotipo, tanto in vitro como in vivo (10).

Ashworth y col. (141) fueron los primeros en señalar una identidad común para los aglutinógenos y la fimbria, y distinta de la hemaglutinina filamentosa. Esta tiene una estructura helicoidal, de 22 kDa, careciendo de la capacidad de aglutinar hematíes.

Preston considera los aglutinógenos 1 a 3 como aglutinógenos mayores y a los aglutinógenos 4 a 6 como aglutinógenos menores, en *B. pertussis* (152). El aglutinógeno 1 tiene una localización fimbrial y en la superficie de la bacteria; el aglutinógeno 2 se localiza en la fimbriae o pili. La localización del aglutinógeno 3 es más discutida. Preston no puede identificarlo en la fimbria utilizando la microscopía electrónica, observándolo a nivel de la superficie celular. Los aglutinógenos mayores 2 y 3 juegan un papel importante en la adhesión de la bacteria a los cilios de las

células respiratorias (aglutinógeno 2) y en la producción de la respuesta de anticuerpos por parte del huésped contra *B. pertussis* (aglutinógenos 2 y 3) (131,153).

La localización del aglutinógeno 1 sobre la superficie celular y sobre la fimbriae sugiere que este aglutinógeno puede ser varias entidades, no una única proteína (152). La localización del aglutinógeno 1 en la superficie de la bacteria parece no conferirle ningún papel en la adhesión de la bacteria, ni en la producción de anticuerpos, por lo que la Organización Mundial de la Salud, aunque recomienda la inclusión de los aglutinógenos 1, 2 y 3 en la elaboración de las vacunas, no lo considera necesario (154).

En la actualidad hay discrepancias acerca de la nomenclatura debido a la existencia de dos diferentes sistemas de serotipificación; el de Eldering en los Estados Unidos y el de Preston en Gran Bretaña. Los sueros que tipifican los factores 3 y 6 del sistema de Eldering corresponden a los que tipifican el factor 3 de Preston, reconociendo subunidades fimbriales de 21.5 kDa. El suero dirigido contra el factor 3 de Eldering también reconoce una proteína de 69 kDa (152).

Tabla 1.4. Antígenos fase I del género *Bordetella*

Antígenos.	<i>B.pertussis</i>	<i>B.parapertussis</i>	<i>B.bronchiseptica</i>
Factor 7	+	+	+
Factor 1	+	-	-
Factor 14	-	+	-
Factor 12	-	-	+
Factores 2 3,4,5,6,13	+a		
Factores 8,9,10		+	
Factores 8 9,10,11,13			+a
Antígeno O	+	+	+
LPF	+	-	-
LPS	+	+	+
HTL	+	+	+

a. Algunas cepas.

LPF:factor promotor de la linfocitosis/toxina pertussis, etc.

LPS:lipopolisacárido.

HLT:toxina termolábil/dermonecrótica.



#### 1.9.6.- Lipopolisacáridos (LPS)

Todas las especies de bordetelas contienen endotoxinas como cualquier otra bacteria Gram negativa. Es un lipopolisacárido termoestable localizado en la superficie celular, no difundiendo al exterior por lo que se cree que su papel en la patogénesis de la enfermedad es mínimo. Estudios estructurales de estos lipopolisacáridos parecen señalar una estructura química diferente a los otros LPS de las enterobacterias. Todos los lipopolisacáridos derivados de bordetelas contienen heptosa, ácido 3-deoxi-D-manosa-2-octulosónico, glucosamina, ácido urónico, fosfatos y ácidos grasos, siendo algunos de estos ácidos grasos específicos de cada especie.

Se han identificadas dos fracciones lipídicas, denominándose las: lípido A y lípido X. El lípido A, que contiene la actividad tóxica en otras endotoxinas bacterianas, es inactivo en *B. pertussis*, estando asociada su actividad biológica con el lípido X. Las vacunas celulares contienen estos lipopolisacáridos (3,14,118).

#### 1.9.7.- Toxina dermonecrótica

También denominada toxina termolábil, fue la primera toxina identificada que estaba producida por *B. pertussis*. Como su nombre indica, origina una lesión inflamatoria con necrosis de la piel en el ratón tras su inoculación intradérmica a bajas dosis. A altas dosis produce su muerte. También se la llama toxina termolábil por la pérdida de actividad biológica que experimenta cuando se calienta a 56° C

durante 10 minutos. La mayoría de su actividad tóxica, si no toda, se localiza en el citoplasma de la bacteria, no siendo segregada al exterior. El peso molecular de la toxina producida por *B. pertussis* oscila entre 89 y 102 kD, estando constituida por cuatro cadenas polipeptídicas, dos de 30 kD y dos de 24 kD. Su actividad biológica consiste en provocar una vasoconstricción, con la consecuente disminución del flujo sanguíneo y la producción de isquemia. Está aún por aclarar su papel en la tosferina (3,14,118).

#### 1.9.8.- Otras sustancias

Otras sustancias poco estudiadas hasta la actualidad, con un papel desconocida en la patogénesis de la enfermedad y en la respuesta inmunológica contra la pertussis, son las hemolisinas (sugeridas a partir de la observación de zonas de hemólisis en los medios de cultivo con sangre) (134) y las proteínas exteriores de membrana, fundamentalmente una proteína de 69 kD o pertactin, de localización no fimbrial y que produce anticuerpos aglutinantes en el ratón. Esta proteína se detecta en todas las cepas virulentas de *B. pertussis*. Proteínas antigénicamente similares a ésta se encuentran en otras especies de bordetelas (155-157).

### 1.10.- Metodologías para el diagnóstico de las infecciones causadas por *B. pertussis*.

#### La insensibilidad del cultivo. Alternativas diagnósticas

Mientras el cultivo positivo, considerado el "estándar de oro" o referencia para el diagnóstico de pertussis, es una herramienta diagnóstica totalmente específica (54,120), su sensibilidad puede ser extraordinariamente baja (158,159), dependiendo de múltiples factores, tanto técnicos como poblacionales:

- Retraso en la toma del espécimen mas allá de tres semanas del comienzo de la tos (159,160).
- Recogida inadecuada del mismo (55,161,162).
- Manejo de la muestra inapropiado (56,163,164).
- Crecimiento de otras bacterias u hongos (57).
- Ausencia de requerimientos específicos para *B. pertussis*, o falta de reconocimiento de la misma (57,58,165).
- Sujetos vacunados, edad de los individuos, terapia antibiótica previa, etc. (3,13,40,46,59,60).

Consecuentemente, nuevas Metodologías son necesarias si se quiere conocer la realidad de la enfermedad, su verdadera incidencia, la inmunidad conferida después de la vacunación o el padecimiento de la misma, su distribución en los distintos grupos de edades, su perpetuación en el tiempo, etc. Diversas alternativas han surgido al respecto pudiéndose clasificar, básicamente, en dos grandes líneas, dependiendo de la fase de evolución de la infección:

- La estrategia más precoz en el tiempo es la dirigida a detectar la bacteria, su genoma, o los productos elaborados por la propia bacteria.
- La otra gran alternativa, más tardía en la evolución de la infección pero con mayores éxitos diagnósticos, está enfocada a medir la respuesta del individuo contra los antígenos o epitopos bacterianos, es decir, la producción de anticuerpos contra antígenos de *B. pertussis*.

#### 1.10.1.- Metodologías basadas en la detección de la propia bacteria o sus productos

Las Metodologías desarrolladas para la detección de productos bacterianos tienen el inconveniente de necesitar especímenes obtenidos en las primeras semanas de evolución de la enfermedad, es decir, en el período en que la sintomatología producida por *B. pertussis* puede ser prácticamente indistinguible de cualquier proceso respiratorio banal (resfriado, gripe, etc). A no ser que se esté en una fase epidémica, difícilmente los pacientes llegaran a tiempo de poder aislar en sus especímenes (suero, orina, secreciones nasofaríngeas, etc) la bacteria o los productos relacionados con ella. Además, algunas de las Metodologías desarrolladas al respecto requieren equipos costosos que no poseen la mayoría de los centros hospitalarios, siendo, por otra parte, métodos que consumen una cantidad de tiempo importante y precisan un personal especializado. Maslow y col. han realizado recientemente, en 1993, una excelente revisión de los últimos avances en el diagnóstico bacteriológico (166).

#### 1.10.1.1.- Inmunofluorescencia directa contra la *B. pertussis*

El prolongado tiempo necesario para el crecimiento de *B. pertussis* en su medio de cultivo, llevó al desarrollo de anticuerpos marcados con isocianato de fluoresceína dirigidos contra la bacteria. Con este método de fluorescencia directa se intentaba identificar la bacteria en los especímenes de frotis nasofaríngeos, obviándose la necesidad de la viabilidad bacteriana. La calidad analítica de esta técnica ha sido motivo de fuerte controversia en la literatura desde el punto de vista de su sensibilidad y especificidad (14,20,24,34,54,61,80,113, 120,121,167-175). Presenta la enorme ventaja de su rapidez, bajo coste y , fundamentalmente, el poder de detectar bacterias muertas en los individuos con tratamiento antibiótico, en donde posiblemente el sería negativo. Las bacterias muertas de la nasofaringe se podrían adherir a la torunda e identificarse en las preparaciones mediante tinción con inmunofluorescencia. A partir de 1990, el CDC ha excluido esta prueba como criterio para la confirmación de pertussis por el laboratorio (61).

#### 1.10.1.2.- Contrainmunolectroforesis

Otra metodología sencilla, económica, rápida y útil en el diagnóstico bacteriológico es la Contrainmunolectroforesis (176). Sobre un soporte de agarosa, un suero anti-*B. pertussis* es enfrentado contra muestras de suero, orina, o secreciones nasales, obteniéndose una o varias líneas de precipitación después de una electroforesis de 30 min. Boreland y Gillespie refieren una sensibilidad que

oscilaba entre un 53% para las muestras de sueros y un 33% para las de orina, frente a una sensibilidad del 47% para el cultivo (177).

#### 1.10.1.3.- Pruebas diagnósticas basadas en la toxina pertussis

La toxina pertussis es la causante de la gran mayoría, si no de toda, de la sintomatología desarrollada durante la enfermedad. Aunque todas las especies del género tienen los genes que codifican esta toxina, únicamente la produce *B. pertussis* (9,135). Por tanto, no es de extrañar que se hayan desarrollado métodos basados en la exteriorización de sus efectos citopatológicos in vitro, o en la neutralización de los mismos mediante anticuerpos monoclonales, específicos contra esta toxina. *B. pertussis* no atraviesa la mucosa respiratoria y es allí donde produce y segrega la toxina pertussis. Posteriormente, la toxina pertussis atraviesa la mucosa respiratoria y a través del torrente circulatorio se distribuirá por toda la economía del individuo.

Se han desarrollado técnicas para la detección de esta toxina en aspirados nasofaríngeos con una gran sensibilidad, capaces de detectar un mínimo de dos colonias in vitro y con una especificidad del 100%. La positividad de estas pruebas referida por sus autores alcanza al 45% de los cultivos positivos, frente al 26% de la inmunofluorescencia directa (178,179).

También se puede evidenciar la presencia de la toxina pertussis mediante la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la toxina aislada de

especímenes respiratorios obtenidos con torundas, aspirados, o lavados, usando un enzimo inmunoensayo con aplicación puntual de la muestra sobre membranas de nitrocelulosa. Friedman y col. notifican un límite de detección de 10 ng de toxina pertussis por punto, una sensibilidad del 100% y una especificidad del 88% (180).

#### 1.10.1.4.- Pruebas diagnósticas basadas en la detección de adenilato-ciclasa

A partir de la observación de que la presencia extracelular de adenilato-ciclasa está ocasionada únicamente por bordetela, la detección de esta enzima en las secreciones nasofaríngeas puede ser un marcador específico de infección por este organismo. La prueba consiste en la incubación de las torundas utilizadas en la toma de muestra de la nasofaringe con adenosin trifosfato y calmodulina, midiéndose por radioinmunoensayo la formación de 3':5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). El ensayo es capaz de detectar un mínimo de 100 bacterias, no hallándose AMPc en secreciones nasofaríngeas de voluntarios sanos, ni en torundas que contenían otros microorganismos (120,181).

#### 1.10.1.5.- Pruebas diagnósticas basadas en el estudio del genoma

La reacción de polimerasa en cadena (PCR) es una revolucionaria herramienta del diagnóstico microbiológico empleada para el estudio de numerosas enfermedades infecciosas, particularmente aquellas originadas por organismos que muestran una gran dificultad en su aislamiento (166,182-184). El rápido avance experimentado en los últimos años en biología molecular ha facilitado el aislamiento

de clones y subclones específicos del género *bordetella* y su aplicación en el estudio de la pertussis en aspirados nasofaríngeos.

Reizenstein y col. (185) utilizaron aspirados nasofaríngeos depositados en membranas de nylon hibridadas con el clono pB23 o con el subclono pRZ61, fragmento de 0.5 kb que contiene una secuencia repetida de parte del clono pB23. El límite de detección referido está cercano a las  $5 \times 10^3$  bacterias. La sensibilidad de la hibridación del DNA es estimada con respecto a la serología de los 179 pacientes estudiados. Dependiendo del fragmento de DNA utilizado, y de la incubación o no de las membranas de nylon en Bordet- Gengou previa a la hibridación, la sensibilidad oscilaba entre un 35% y un 69%. El porcentaje de cultivos positivos estaba alrededor del 50%. Tomando los cultivos positivos como referencia, la sensibilidad de la hibridación aumentaba hasta un 50% para el pB23 y un 86% para el pRZ61. La especificidad de la prueba variaba de acuerdo con el tiempo de las incubaciones previas de las membranas de nylon en medio de Bordet-Gengou y del fragmento de DNA utilizado, estando comprendidas en un rango entre el 87% y 99%.

He y col. (186) han publicado en los últimos meses los resultados obtenidos con una PCR en aspirados nasofaríngeos, con un límite de detección de  $2.5 \times 10^4$  por mL. La sensibilidad de la prueba se situaba en un 48% frente a un 5% del cultivo, siempre que el estudio se haga antes de las seis semanas del comienzo de la sintomatología. La especificidad la sitúan en un 100%. Resultados similares han sido comunicados por Glare y col. (187).



#### 1.10.1.6.- Otras pruebas

Diversos anticuerpos monoclonales han sido producidos contra otros productos elaborados por la bacteria como la hemaglutinina filamentosas y los lipopolisacáridos, con unos límites de detección de 2  $\mu$ g de lipoligosacáridos,  $5 \times 10^8$  bacterias por mL o  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias (188-190).

#### 1.10.2.- Metodologías basadas en la detección de anticuerpos contra la bacteria o sus productos

El aislamiento e identificación de los agentes infecciosos es el método de referencia para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Pero cuando esto es difícil, una de las alternativas existente es el uso de las pruebas serológicas para detectar los anticuerpos contra los antígenos bacterianos (191). James (192) publicó una exhaustiva y actualizada revisión sobre el tema en 1990, la cual debe ser tenida en cuenta a la hora de implementar una prueba para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas.

Las pruebas utilizadas para detectar la presencia o aumento de anticuerpos específicos pueden estar basadas, fundamentalmente, en:

- El uso del Complemento (193-194).
- Ensayos de neutralización (195).
- Aglutinación pasiva, inhibición de la aglutinación (196).

- Inmunofluorescencia indirecta (197).
- Enzimoimmunoensayos (198).

#### 1.10.2.1.- Pruebas basadas en la medición de la actividad del complemento

Las pruebas basadas en la medición de la actividad del complemento requieren una minuciosa predeterminación de la concentración de todos los componentes, menos el suero del paciente, debido al estrecho rango de las diluciones óptimas de estos componentes. Además, precisan numerosos controles por la inestabilidad de las proteínas del complemento, y los cambios de actividad de éstas con el tiempo y con los lotes. Por otra parte, los hematíes presentan importantes variaciones físico-químicas de unos lotes a otros dificultando enormemente su estandarización (193,194,199).

#### 1.10.2.2.- Pruebas basadas en la neutralización de la actividad de sustancias producidas por la bacteria

Los ensayos de neutralización son sensibles y específicos. Presentan los inconvenientes de ser muy laboriosos, caros y no estar al alcance de la mayoría de los laboratorios. La gran mayoría de los ensayos de neutralización miden anticuerpos dirigidos contra el factor promotor de la linfocitosis o toxina pertussis (179,195,200). No obstante, Farfel y col. (201) han descrito un ensayo que detecta anticuerpos humanos con capacidad de inhibir la actividad que ejerce la adenilato ciclasa generada por *B. pertussis* sobre los linfocitos humanos. Los anticuerpos dirigidos

contra la adenilato ciclasa se producen después de las vacunaciones y de la infección por *B. pertussis*. Atraviesan la placenta y desaparecen a los pocos meses después del nacimiento.

Arciniega y col. (202) detectan anticuerpos dirigidos contra varios antígenos de *B. pertussis*, entre ellos contra la adenilato ciclasa, mediante el "immunobloting".

#### 1.10.2.3.- Pruebas basadas en la aglutinación

Los métodos que utilizan la aglutinación o su inhibición como revelador de la reacción antígeno-anticuerpo tienen el inconveniente de su poca sensibilidad ya que suelen detectar, principalmente, anticuerpos del isotipo IgM. Este isotipo presenta una capacidad aglutinante superior a la IgG. Por el contrario, los anticuerpos del isotipo IgM tienen el inconveniente de alcanzar unos niveles más bajos y poseer una vida media más corta que el isotipo IgG (174,196,203,204,269).

#### 1.10.2.4.- Pruebas basadas en la inmunofluorescencia indirecta

Las pruebas basadas en la inmunofluorescencia indirecta tienen una gran sensibilidad, son económicas y no requieren un número determinado de muestras para su ejecución. Presentan el inconveniente de la subjetividad del observador para obtener el punto final de la titulación o "concentración" (205). Los anticuerpos IgM pueden quedar enmascarados ante la presencia de títulos altos de IgG. Estos últimos, al tener mayor afinidad por el sustrato, pueden impedir alostéricamente la

unión de la IgM al sustrato. Una solución posible es aumentar el tiempo de incubación y las diluciones de los especímenes (197).

#### 1.10.2.5.- Pruebas basadas en enzimoimmunoensayos

Los enzimoimmunoensayos tienen la misma sensibilidad que la inmunofluorescencia pero sin la subjetividad que el observador aporta a la prueba (198,206). Presentan los inconvenientes de la falta de unificación en los criterios de estandarización en cuanto a los antígenos utilizados [bacterias completas (119,207,208), hemaglutinina filamentosa, toxina pertussis, pertactin (63,157,168,174,209-212), adenilato-ciclase (201), etc.] sueros de referencia, protocolo y métodos de cálculo de los resultados, lo que hace imposible la comparación entre laboratorios (198,213,214). Su gran ventaja reside en su capacidad de procesar de forma automática un gran número de muestras.

## **2.- OBJETIVOS**

Los objetivos de esta Tesis Doctoral fueron motivados por la necesidad de llegar a identificar las infecciones causadas por *B. pertussis* en la labor asistencial diaria.

La idea de utilizar la serología, fijando como objetivo principal de este trabajo el estudio de **"La utilidad de la inmunofluorescencia indirecta en el diagnóstico de las infecciones causadas por *Bordetella pertussis*"** surgió como consecuencia de los siguientes hechos:

- Los síntomas clínicos aportan una deficiente calidad diagnóstica (sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, eficiencia).
- El diagnóstico bacteriológico tiene escasa sensibilidad para la identificación de las infecciones producidas por *B. pertussis*.
- Probablemente, los pacientes (por la propia naturaleza del cuadro clínico) van a llegar al laboratorio con una enfermedad evolucionada, haciendo prácticamente imposible el aislamiento de *B. pertussis* en los especímenes nasofaríngeos.

Se investigaron, en los sujetos remitidos con diagnóstico de presunción de pertussis, los siguientes puntos:

- 1º Concentraciones e isotipos de los anticuerpos séricos dirigidos contra *B. pertussis*.
- 2º Evolución de las concentraciones e isotipos de anticuerpos séricos dirigidos contra *B. pertussis*.
- 3º Concentraciones e isotipos de los anticuerpos en saliva dirigidos contra *B. pertussis*.
- 4º Comparación del serodiagnóstico de pertussis con el diagnóstico bacteriológico (cultivo e inmunofluorescencia directa) y el diagnóstico clínico.

Para poder alcanzar los objetivos anteriormente expuestos, había que poseer información previa de la población de donde se extrajo la muestra enviada al laboratorio con sospecha de tosferina. Para lo cual se estudiaron los siguientes apartados:

- 1º Prevalencia, concentraciones e isotipos de anticuerpos séricos dirigidos contra *B. pertussis* en recién nacidos y sus madres.
- 2º Evolución de los anticuerpos séricos del recién nacido.

- 3º Prevalencias, concentraciones e isotipos de anticuerpos séricos producidos en respuesta a las distintas dosis de vacuna.
- 4º Evolución de las concentraciones e isotipos de los anticuerpos séricos producidos por la inmunización primaria.
- 5º Seroprevalencia, concentraciones e isotipos de anticuerpos séricos en distintos grupos de edad. Desde la niñez hasta la vejez.
- 6º Establecimiento de rangos de referencia serológicos.
- 7º Concentraciones e isotipos de anticuerpos dirigidos contra *B. pertussis* en saliva.

Por último, conviene recordar la enorme importancia que los estudios serológicos tienen en la detección de las infecciones clínicas y subclínicas. En éstas últimas, la reacción del huésped al agresor suele quedar limitada a una respuesta inmunológica humoral, únicamente demostrable por métodos serológicos.



## **3.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3.1.- Muestra

#### 3.1.1.- Area demográfica

La muestra se recogió entre sujetos pertenecientes al Area Sanitaria 10 de Madrid, situada en la zona centro sur de la provincia. Su área de atención abarca a un total de trece municipios: Arroyomolinos, Batres, Casarrubuelos, Cubas, Getafe, Griñón, Humanes, Moraleja de Enmedio, Parla, Pinto, Serranillos del Valle, Torrejón de la Calzada y Torrejón de Velasco.

Los trece municipios, que componen el Area 10, suponen una población total de 247.294 habitantes, repartidos en una superficie de 368.8 Km<sup>2</sup> y con una densidad de población de 655.7 personas por Km<sup>2</sup>, oscilando entre un máximo de 2744.9 habitantes por Km<sup>2</sup> de Parla a los 13.8 habitantes por Km<sup>2</sup> de Batres.

#### 3.1.2.- Datos demográficos

Del conjunto de los municipios que integran el área, Getafe, Parla y Pinto suponen el 94% de la población total, siendo su distribución la siguiente:

- Mayores de 65 años      14.590 (5.9%).
- Menores de 15 años      63.800 (25.8%).
- Entre 15 y 65 años      168.654 (68.2%).

El segmento piramidal predominante se encuentra entre los 35 y 44 años. Por sectores de actividad , destaca el sector servicios con un 45.7%. La industria/construcción ocupa el segundo lugar, con un 42.33%. Por último la agricultura/ganadería con una incidencia mínima del 12%. (231)

### 3.1.3.- Cohorte de estudio

La selección de los individuos que iban a integrar la muestra del estudio longitudinal se realizó conjuntamente con el Jefe del Servicio de Pediatría del Hospital Central de la Cruz Roja, Dr Taracena del Piñal. Se estableció que los niños deberían reunir estas tres condiciones para su inclusión en el protocolo:

- 1ª) Tos de más de diez días de duración.
- 2ª) Reagrupamiento de la tos en ataques.
- 3ª) Fiebre inferior a 38°C o ausencia de la misma.

### 3.1.4.- Encuesta

Para la elaboración de la encuesta de recogida de los datos se consultaron las obras de Milos Jenicek-Robert Clérout (232) y Kenneth J. Rothman (233). Posteriormente, la encuesta fue adaptada al diseño informatizado EPI5, desarrollado por los Centers for Disease Control (CDC) (234).

En la encuesta se reseñaron:

- datos demográficos,
- fechas de las vacunaciones,
- fecha de la consulta,
- comienzo de la tos,
- predominio o no de la tos por la noche,
- fiebre a lo largo de la enfermedad,
- vómitos después de la tos,
- presencia de petequias y su localización,
- tratamiento con antibióticos en este episodio,
- recuentos de leucocitos, linfocitos y eosinófilos,
- glucemia,
- diagnóstico clínico de presunción,
- diagnóstico serológico clínico (título de anticuerpos en suero y saliva) y
- diagnóstico bacteriológico (cultivo e inmuno-fluorescencia directa).

En la encuesta inicial estaban previstas variables socioculturales, pero se decidió no recoger este tipo de información por el malestar que tales preguntas provocaban entre los encuestados, produciendo rechazos o intentos confusivos en las respuestas. Posiblemente, este apartado de la encuesta dio lugar, en algunos casos, al abandono del seguimiento del protocolo, no acudiendo a las revisiones posteriores, dado que, según nuestras observaciones, una parte importante de los abandonos coincidían con sujetos que habían manifestado mayor grado de malestar

ante las variables socioculturales. Por otra parte, según los datos aportados por la encuesta seroepidemiológica de la CAM: "La ausencia de significación estadística entre <<vacunación completa>> y <<nivel de instrucción>> de los padres indica que el comportamiento frente a la vacunación de los hijos no depende, en la actualidad del nivel de instrucción alcanzado por los padres" (87).

#### 3.1.5.- Período de tiempo del estudio

El período de tiempo en que se llevó a cabo el estudio está comprendido entre los años 1989 y 1992, ambos inclusive. En la tabla 3.1 se describe el número de casos con sospecha de pertussis investigados por año. Se observa una disminución en el número de casos remitidos para el estudio de tosferina durante los años 1990 y 1991. En la valoración de este descenso hay que tener en cuenta la coincidencia del estudio con el traslado del personal desde el Hospital Central de la Cruz Roja al Hospital Universitario de Getafe, hecho que influyó negativamente en la demanda de estudios de pertussis. Los casos con diagnóstico serológico clínico o cultivo positivo fueron seguidos periódicamente hasta que su título de anticuerpos alcanzó unos niveles iguales o inferiores a los encontrados en el grupo de referencia. En total se estudiaron 162, 51 (31.5%) de los cuales tuvieron confirmación positiva por el laboratorio.

Tabla 3.1. Casos remitidos para estudio de tosferina (%).

Casos	1989	1990	1991	1992
Positivos	4 (8,7%)	10 (52,6%)	12 (46,1%)	25 (35,2%)
Negativos	42 (91,3%)	9 (47,4%)	14 (53,9%)	46 (64,8%)
Total	46	19	26	71

### 3.1.6.- Cohorte de referencia

La muestra de referencia, para la valoración de la prevalencia y títulos e isotipos de los anticuerpos anti-*B. pertussis*, se obtuvo a partir de sueros pertenecientes a 2589 sujetos de ambos sexos con edades comprendidas entre las cero horas (sangre de cordón) y 90 años, distribuyéndolos en diversos grupos de edades. El cálculo de la muestra necesaria para estimar las prevalencias de anticuerpos se realizó con la calculadora epidemiológica que lleva incorporada el programa EPI5, asumiendo una prevalencia estimada del 50% (la asunción más desfavorable), un nivel de confianza del 95% y un poder (1- $\beta$ ) de la estimación variable dependiendo del número de sujetos que formaban cada grupo. Este poder nunca fue inferior al 80%. Con estos datos, la muestra mínima necesaria para ser representativa sería de 96 sujetos. Se estudiaron 2589 sujetos, en muchas ocasiones más de los necesarios, para intentar contrarrestar el posible sesgo introducido por la obtención de la muestra en sujetos que acudían al hospital o a los centros de Atención Primaria del área con otras finalidades médicas. Esto tuvo la ventaja de la facilidad para la obtención de sueros, pero también las desventajas de que podemos estar introduciendo un sesgo en la selección de personas, que podría no ser

representativa de la población del Área 10. Seguramente, en este área y debido al nivel socioeconómico de la población que la integra, el Universo Objeto no diste mucho del Universo de Trabajo, aunque casi siempre quedará fuera la población marginal que no acude a los centros de salud. Por otro lado, la prevalencia de anticuerpos no tiene porqué verse sesgada dependiendo del tipo de asistencia sanitaria elegida, pública o privada, y por tanto los resultados obtenidos pueden ser perfectamente extrapolables a todos los habitantes de este área y de otras áreas sanitarias con características similares.

#### 3.1.6.1.- Procedencia de los especímenes estudiados

Los especímenes estudiados tenían distinta procedencia dependiendo de los grupos de edad. Los sueros de cordón, junto con una muestra de sangre materna, provenían del paritorio (colaborando en su recogida el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de Getafe). El resto de los sueros pertenecían a personas que acudían a la consulta externa del laboratorio por diversos motivos, o de donantes. Los donantes fueron incluidos en la cohorte de referencia debido a la dificultad encontrada para obtener en la consulta externa especímenes de personas con edades comprendidas entre los 18 y 30 años.

Las muestras de saliva de 261 sujetos sin patología respiratoria, ingresados o ambulantes, fueron analizadas para obtener la referencia del nivel e isotipos de anticuerpos anti-*B. pertussis* en saliva.

### 3.1.6.2.- Estratificación de la cohorte control

Siguiendo criterios estadísticos y descriptivos, la muestra de referencia se estratificó en cinco grandes grupos. Cada uno de estos grupos a su vez fueron estratificados en los subgrupos necesarios para facilitar la comprensibilidad de los resultados.

Estos grandes grupos están integrados por especímenes pertenecientes a sujetos con edades comprendidas entre:

- Las cero horas y los 3 meses. Neonatos y lactantes sin vacunar.
- Entre los 3 y 12 meses. Lactantes vacunados.
- Entre los 13 meses y los 4 años. Primera infancia.
- Entre los 4 años y los 15 años. Segunda infancia.
- Mayores de 15 años. Adolescentes y adultos.

En el primer grupo se estudiaría las transferencias placentarias de anticuerpos maternos y su duración en el tiempo. En el segundo grupo se evidenciaría la respuesta humoral a las distintas dosis de vacunas. Con el tercer grupo se vería la evolución y duración de los niveles séricos de anticuerpos postvacunales. Con el cuarto grupo se seguiría estudiando la evolución de los anticuerpos producidos en respuesta al calendario de vacunas, así como las posibles infecciones que pudieran producirse como consecuencia del debilitamiento de la inmunidad post-vacunal. El quinto grupo, en un principio, estaba formado por los sujetos nacidos después de



la introducción de la vacuna contra la tosferina en España, en 1965 (87). Había un sexto grupo constituido por aquellos individuos nacidos antes de 1965 y que, por tanto, no habían podido ser vacunados. Posteriormente estos dos grupos, quinto y sexto, se unieron en un sólo grupo porque no se pudo demostrar ninguna diferencia serológica entre ellos.

### 3.2.- MÉTODOS

#### 3.2.1.- Aislamiento de *B. pertussis*

Un diagnóstico inequívoco de pertussis depende del aislamiento de *B. pertussis*, pero al menos que un buen espécimen pueda ser recogido en la fase precoz de la enfermedad, el cultivo puede ser negativo, a pesar de los medios idóneos disponibles en la actualidad.

El aislamiento de *B. pertussis* ha sido y sigue siendo un gran problema para muchos laboratorios. Muchas de estas dificultades residen, aparte de las relacionadas con la propia bacteria, en la metodología utilizada para la recogida de la muestra pudiéndose destacar los siguientes puntos (57):

- Toma de la muestra incorrecta.
- Retraso en el envío de la muestra al laboratorio (no ocurre en nuestro caso).
- Crecimiento de otras bacterias u hongos en el medio de cultivo.

- Ausencia de requerimientos específicos para *B. pertussis* en el medio de cultivo.
- Falta de experiencia en el reconocimiento de la bacteria.
- Utilización del cultivo directo como única técnica para su aislamiento.

### 3.2.1.1.- Pautas para la toma de muestra bacteriológica

En la recogida y procesamiento de las muestras bacteriológicas se siguieron las recomendaciones de Parker y Payne (113) y Regan (57).

Mientras una enfermera inmovilizaba hacia atrás la cabeza de los lactantes o niños pequeños, personalmente realizaba una toma profunda de cada fosa nasal con torundas finas y flexibles de alginato cálcico (Landerdiagnóstico, S.A. Madrid). Las torundas se mantenían el mayor tiempo posible dentro de cada fosa nasal, generalmente unos 15 o 20 segundos, ya que rápidamente se desencadenaba un ataque de tos. En los niños mayores y adultos, el tiempo de permanencia de las torundas en el interior de las fosas nasales fue superior pero nunca se llegó a alcanzar el tiempo de 1 o 2 minutos recomendado por algunos autores (118).

Inmediatamente después de la toma de cada muestra, junto al paciente, se sembraba una torunda en los medios de aislamiento (selectivo y no selectivo) y posteriormente se introducía en un tubo con medio de transporte. La otra torunda se ponía en un tubo conteniendo 0.5 mL de una solución estéril de hidrolizado de caseinato al 0.1% . A la llegada al laboratorio, se agitaba el tubo de caseinato que

contenía la torunda durante 30 s en un agitador de tubos y, posteriormente, la torunda era introducida en el medio de transporte. La permanencia de la torunda en el hidrolizado de caseinato nunca fue superior a 30 minutos.

Tanto los medios de aislamiento como el de transporte o enriquecimiento se llevaban a una estufa a 36°C, 9% de CO<sub>2</sub> y atmósfera húmeda. Transcurridas 48 horas de la incubación del medio de transporte y a partir de las torundas que estaban en este medio, se hacía una resiembra en medio de aislamiento selectivo. El medio de transporte se utilizó para optimizar el mayor número de aislamientos, no porque se produjera un retraso entre la toma del espécimen nasofaríngeo y la siembra en el medio de cultivo (57,161,163,235-237).

Los medios de aislamiento se observaban todos los días durante 14 días antes de informar definitivamente el cultivo como negativo. A los siete días de cultivo, si no se observaba crecimiento de colonias, se avanzaba un resultado provisional negativo.

#### 3.2.1.2.- Tipos de torundas para la recogida de muestra

Varios tipos de torundas (algodón, dacrón, rayón y alginato cálcico) han sido recomendadas para la toma de las secreciones nasofaríngeas en el estudio de la tosferina. De todas ellas, y a partir de un estudio comparativo de Hoppe y Weiß con estos cuatro tipos de torundas y utilizando el mismo medio de transporte y aislamiento, las torundas de alginato, seguida por las de dacrón, eran las que daban los mejores resultados en el crecimiento de colonias a partir de una preparación de

*B. pertussis* estandarizada y con condiciones controladas de temperatura y tiempos de incubación. En lo referente al aislamiento de la bacteria a partir de especímenes humanos, las torundas de alginato cálcico eran las que producían los mayores porcentajes de positivities en el aislamiento de la bacteria (36% de aislamientos con las torundas de alginato, seguido por las torundas de dacrón, 26%; rayón, 23% y algodón 22%). La conclusión final de este estudio es la recomendación de torundas de alginato cálcico en las tomas de secreciones nasofaríngeas para el estudio de *B. pertussis* (238). No se aconseja la utilización de las torundas de algodón ya que éste puede contener ácidos grasos que inhiben el crecimiento de esta bacteria (56,238,239).

### 3.2.1.3.- Medio de aislamiento

Aunque todavía se sigue utilizando con buenos resultados el medio desarrollado por Bordet-Gengou, éste presenta una serie de desventajas que ha originado la búsqueda de medios alternativos para el aislamiento de *B. pertussis*. La mayor desventaja que presenta este medio es su corta vida debido al alto porcentaje de sangre que forma parte de su composición (15 al 20% de sangre desfibrinada de caballo u oveja) . Esto implica la preparación del medio en el mismo momento de la llegada de la solicitud del estudio. En el estudio comparativo realizado por Hoppe y Vogl sobre tres medios de aislamiento (Regan-Lowe, Bordet-Gengou y Jones-Kendrick) recomiendan el uso del medio de Regan-Lowe por obtener crecimientos más rápidos, mayor número de colonias y desarrollo de un amplio número de cepas distintas de bordetelas (240).

El medio de Jones-Kendrick posee una vida media de 2 a 3 meses, superando las 8 semanas de vida media del Regan-Lowe, pero produce unos resultados algo inferiores con respecto al medio de Regan-Lowe. (54,241).

Todos estos estudios apuntan al medio de Regan-Lowe como el más sensitivo, selectivo y con una vida media muy superior al medio de Bordet-Gengou. La incorporación de carbón activo al medio produce la absorción de los productos tóxicos generados por la propia bacteria y que impiden su crecimiento (54,57,113,162,165,240,242,243).

Recientemente, otro medio ha sido incorporado a la batería de medios para el aislamiento de *B. pertussis*. Es un medio completamente sintético constituido por Stainer-Scholte agar, ciclodextrina y cefalexina (244-246). Presenta la ventaja de que la ciclodextrina estimula el crecimiento de *B. pertussis*, suprimiendo el crecimiento de la flora nasal normal. Se obtiene buenos aislamientos y tiene una vida media de 3 meses. Su desventaja mayor es que la ciclodextrina es un producto caro.

En 1989, Hoppe y Schwaderer compararon cuatro medios a base de carbón activo para el aislamiento de *B. pertussis* a partir de una suspensión de bordetelas en saliva. Este estudio incluyó los siguientes medios: agar-carbón con sangre de caballo y cefalexina; agar-carbón con sangre de caballo y lincomicina; agar-carbón sin sangre de caballo y con lincomicina y un cuarto medio utilizado para el aislamiento de *Legionella* (buffered charcoal-yeast extract. BCYE) suplementado con lincomicina y anisomicina. Los mejores resultados los obtuvieron con agar-carbón

con sangre de caballo y cefalexina. Los crecimientos fueron más rápidos, el número de colonias fue mayor y el crecimiento de la flora faríngea fue totalmente suprimido. La recuperación en este medio fue de un 100%. En los otros medios, las recuperaciones fueron inferiores al 85% y el crecimiento de la flora faríngea normal se produjo en más del 50% de las siembras. En un estudio de campo con estos cuatro medios, las recuperaciones de *B. pertussis* oscilaron entre un 21.9% del medio a base de agar-carbón con sangre de caballo y cefalexina, y un 7.4% en el medio con agar-carbón sin sangre de caballo y con lincomicina (243).

Ahmad y Calder recomiendan la utilización simultánea de los medios de Regan-Lowe y Bordet-Gengou para evitar la pérdida de algunas cepas de *B. Pertussis* que sólo crecen en uno de estos medios (247).

Para la realización de este trabajo se utilizó el medio de Regan-Lowe (170). Se preparó medio no selectivo, sin la adición de antibióticos para evitar una posible sensibilidad de *B. pertussis* a la cefalexina (113,243), y medio selectivo con la incorporación al medio de cefalexina y anfotericina .

En los dos medios las concentraciones de agar-carbón y sangre desfibrinada de caballo eran iguales. La composición del medio selectivo fue la siguiente:

- 26 g de agar-carbón, (Oxoid CM 119, Basingstoke, England),
- 50 mL de sangre de caballo desfibrinada,
- 20 mg de cefalexina,

- 25 mg de anfotericina y
- 500 mL de agua destilada.

Se siguieron las recomendaciones de Regan-Lowe para su preparación, almacenándolo a 4°C durante un máximo de 8 semanas (170).

#### 3.2.1.4.- Medio de transporte o enriquecimiento

Su composición es idéntica al medio selectivo de aislamiento pero con la mitad de la concentración de agar-carbón que tiene éste.

Cuatro o cinco ml del medio de transporte se introducían en tubos de plástico estériles con tapón de rosca. Los tubos se guardaban en nevera a 4°C durante un máximo de 8 semanas.(170).

#### 3.2.1.5.- Control de calidad de los medios

Cada vez que se preparaba medio de aislamiento o de transporte, se efectuaba un control de calidad del medio sembrando un pequeño inóculo de *B. pertussis* almacenadas en leche a -70°C o en Protect Bacterial Preservers (Technical Service Consultants LTD, Heywood Lancs) suministrado por Ditassa.

### 3.2.1.6.- Atmósfera de incubación

No existe un acuerdo unánime acerca de la atmósfera de incubación de los cultivos de *B. pertussis*. Aunque esta bacteria no requiere CO<sub>2</sub> para su crecimiento, varios autores obtienen mejores resultados en una atmósfera de CO<sub>2</sub> que en aire (42,54,55,113,173).

Hoppe y Schlagenhauf observan una ligera disminución en el número de colonias formadas con las incubaciones efectuados en una atmósfera con un contenido de CO<sub>2</sub> entre un 5-10% (media de 72 colonias en las incubaciones con aire frente a una media de 60 colonias en las incubaciones con CO<sub>2</sub>) (242).

Para estudiar la influencia del CO<sub>2</sub> sobre el crecimiento de *B. pertussis* junto con otras bacterias de la flora normal nasofaríngea, se preparó una suspensión de bacterias constituida por bacterias de la flora nasofaríngea más *B. pertussis*. Esta suspensión se sembró en dos placas de: agar sangre, agar chocolate y medio de Regan-Lowe. Una placa de cada medio se incubó en una atmósfera de aire y las otras placas en una atmósfera con un contenido de CO<sub>2</sub> del 9%. A las 72 horas de incubación, el crecimiento en las placas de agar sangre y agar chocolate era muy abundante, tanto en aire como en CO<sub>2</sub>, a base de colonias de flora normal. No se identificó ninguna colonia de bordetela. En el medio de Regan-Lowe, a las 72 horas de incubación, se observó un crecimiento débil de colonias de *B. pertussis* únicamente en la placa incubada en un ambiente de CO<sub>2</sub>. No se vio ningún crecimiento en la placa incubada en aire.



Se repitió el experimento con los mismos medios anteriormente citados y con una suspensión pura de *B. pertussis*. A las 72 horas de incubación, sólo se observó el crecimiento de la bacteria en las placas incubadas en un ambiente de CO<sub>2</sub>.

De estos estudios parecía desprenderse que las incubaciones en CO<sub>2</sub> facilitaba la formación más precoz de las colonias de *B. pertussis*, por lo que se decidió hacer todas las incubaciones en esta atmósfera.

Todas las incubaciones en las distintas atmósferas se realizaron en un ambiente con un alto grado de humedad. No existen discrepancias respecto a este punto, por otra parte lógico, si tenemos en cuenta los largos tiempos de incubación que requieren *B. pertussis*. A 36°C y durante un mínimo de siete días, el medio se deshidrataría en un ambiente seco, lo que haría imposible el crecimiento de *B. pertussis*.

### 3.2.2.- Inmunofluorescencia directa

Se preparaban dos portas comerciales para inmunofluorescencia por paciente. Un porta para incubarlo con suero de pollo anti-*B. pertussis* conjugado con isocianato de fluoresceína (Difco 2359-56-6) y el otro porta para incubarlo con suero de pollo anti-*B. paraptussis* conjugado con isocianato de fluoresceína (Difco 2378-56-3). La preparación de dos portas por paciente se hacía para evitar contaminaciones con los sueros. Ambos portas eran procesados en paralelo y por separado. Una gota del hidrolizado de caseinato, en donde había estado depositada

la torunda, se añadía a cada uno de los cuatro pocillos de cada porta que se preparaba por paciente. Los portas se dejaban secar a temperatura ambiente y posteriormente eran fijados suavemente al calor. Si no se iban a procesar en el día, se envolvían en papel de aluminio y se guardaban en nevera a 4°C. Ninguna preparación estuvo almacenada más de siete días.

#### 3.2.2.1.- Protocolo de inmunofluorescencia

Los portas guardados en nevera se dejaban a temperatura ambiente un mínimo de media hora antes de desenvolverlos para evitar condensaciones de la humedad ambiente. Al mismo tiempo se procesaban otros dos portas preparados con una suspensión pura de *B. pertussis*; estos portas iban a servir de control positivo y negativo.

1º Añadir una gota de la dilución de trabajo del correspondiente suero marcado con fluoresceína a cada pocillo.

2º Incubar los portas en cámara húmeda durante 30 minutos.

3º Remover el exceso de suero golpeando los portas suavemente contra un papel de filtro.

4º Colocar los portas en cestillos para tinciones hematológicas y realizar tres lavados en tampón fosfato salino (PBS, pH 7.6), en un agitador magnético a 300 rpm. El primer lavado con una duración de un minuto y los dos siguientes de 5 min.

5º Hacer un cuarto lavado de un minuto con agua destilada para evitar la posible precipitación de sales.

6º Remover el exceso de líquido como en el paso 3º. Colocar varias gotas de medio de montaje y cubrir las preparaciones con un cubreobjetos. Eliminar el exceso de líquido poniendo los portas entre dos papeles de filtro y ejercer una presión suave sobre ellos para desalojar el aire atrapado entre los cristales.

7º Examinar los portas al microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión buscando pequeños cocobacilos aislados, en pares y ocasionalmente en pequeños grupos.

Se utilizó un microscopio de fluorescencia Leitz Dialux de 12 V y 100 W (Wetzler, Alemania).

Se consideró un resultado positivo cuando se observaba un mínimo de cinco bacterias con una fuerte fluorescencia verde amarillenta por todo el borde de la misma y un débil color verdoso oscuro en el centro (aspecto de "doughnut"). Los portas con una preparación pura de *B. pertussis* debían ser: positivo el incubado con suero anti-*B. pertussis* y negativo el incubado con suero anti-*B. paraptussis*.

### 3.3.2.2.- Preparación de los sueros anti-*B. pertussis*/*B. parapertussis* marcados con isocianato de fluoresceína

Se reconstituyeron los viales con la cantidad indicada en el envase. Una vez disueltos los liofilizados, fueron distribuidos en alícuotas y congelados a -70°C hasta su uso.

La dilución de trabajo correcta para cada conjugado se determinó siguiendo las pautas suministradas con los envases.

La especificidad de estos sueros fue estudiada preparando extensiones con bacterias encontradas habitualmente en las fosas nasales. No se observó fluorescencia en las extensiones preparadas con los siguientes organismos: *Staphylococcus sp*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella sp*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Branhamella catarrhalis*.

### 3.2.2.3.- Tampón PBS 0.15M, pH 7.6

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.24 g.
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.18 g.
NaCl	8.50 g.
H <sub>2</sub> O DESTILADA	1 Litro.

#### 3.2.2.4.- Solución de montaje. Glicerina tamponada

9 partes de glicerina neutra.

1 parte de PBS 0.15M, pH 7.6.

#### 3.2.3.- Inmunofluorescencia indirecta

##### 3.2.3.1.- Preparación de extensiones de *Bordetella pertussis* en portas

A partir de un cultivo puro de *B. pertussis* en un medio de agar chocolate o Regan-Lowe no selectivo (sin antibióticos), se preparaba una suspensión de bacterias en agua destilada estéril con formaldehído al 0.5%. La preparación de la suspensión de bacterias en solución salina estéril produce unas cristalizaciones que impide la correcta visualización de la inmunofluorescencia. Esta suspensión debe tener una ligera opalescencia, equivalente a una transmisión entre un 90 y un 95% a una longitud de onda de 650 nanómetros, 0 a 0.5 U de la escala McFarland de Biomerieux.

Es aconsejable preparar esta suspensión bacteriana a partir de un medio de Regan-Lowe, o cualquier otro medio, sin antibióticos. Los medios con antibióticos originan formas bacilares largas y agrupadas, en vez de formas cocobacilares, dificultándose la visualización de la inmunofluorescencia.

En portas para inmunofluorescencia con 12 pocillos de 6 mm de diámetro, se depositaba 15  $\mu$ L de la suspensión de *B. pertussis* en cada pocillo, extendiéndola sobre toda la superficie del mismo. Los portas se dejaban secar a temperatura ambiente, posteriormente se fijaban suavemente a la llama y se envolvían en papel de aluminio, dejando una capa de papel de aluminio separando cada porta. Estos portas se almacenaban a 4°C, al menos durante seis meses.

Previamente a su utilización, es conveniente dejarlos 30 minutos a temperatura ambiente, antes de desenvolverlos para evitar condensaciones con el cambio de temperatura.

Desde la primavera de 1993, la firma Leti está comercializando unos portaobjetos de *B. pertussis* fabricados por MARDX, referencia 33-8006.

### 3.2.3.2.- Control de calidad de las extensiones de *Bordetella pertussis*

Cada vez que se preparaba un nuevo lote de portas, se realizaba una inmunofluorescencia directa con sueros anti-*B. pertussis* y anti-*B. paraptussis*. Esto era necesario para observar si la extensión de *B. pertussis* estaba formada por una monocapa de bacterias separadas, su morfología era cocobacilar y la calidad del patrón de fluorescencia obtenido era buena. Con el suero anti-*B. pertussis* debemos obtener una fluorescencia periférica muy intensa, mientras que no tenemos que observar ninguna fluorescencia en la incubación realizada con el suero anti-*B.*

*parapertussis*. Las bacterias incubadas con el suero anti-*B. parapertussis* se verán con cierta dificultad, teñidas de un color verde oscuro.

### 3.2.3.3.- Protocolo de inmunofluorescencia indirecta

1º Preparar diluciones seriadas de cada muestra, suero o saliva, en PBS. Las diluciones seriadas de los sueros se realizaban a partir de una dilución 1/10 y las de saliva a partir de una dilución 1/5. La saliva era centrifugada, previamente a la dilución, a 1000 g durante 10 minutos para sedimentar el material particulado que pudiera contener. Para cada dilución se utilizaban tres pocillos, puesto que cada uno de ellos se incubaba con el suero específico anti-inmunoglobulina humana (anti-IgG o anti-IgA o anti-IgM) marcado con isocianato de fluoresceína.

2º Depositar una gota de la dilución apropiada en cada pocillo asegurándose que se extiende bien por toda la superficie del mismo.

3º Incubar los portas en cámara húmeda durante una hora. Con incubaciones de media hora se podía observar la zona central de la preparación con una débil inmunofluorescencia, estando en presencia de una muestra con unos títulos altos de anticuerpos anti-*B. pertussis*.

4º Remover el exceso de líquido golpeando suavemente los portas contra un papel de filtro.

5º Colocar los portas en cestillos para tinciones hematológicas y realizar tres lavados en PBS, en un agitador magnético a 300 rpm. El primer lavado se hace de un minuto y los otros dos restantes de cinco minutos.

6º Quitar el exceso de PBS con papel de filtro evitando que la preparación se seque.

7º Depositar una gota de la dilución de trabajo del suero específico de isotipo marcado con isocianato de fluoresceína (anti-IgG-FITC, o anti-IgA-FITC o anti-IgM-FITC) en su correspondiente pocillo.

8º Incubar media hora los portas en cámara húmeda.

9º Lavar tres veces con PBS como en el paso 5º.

10º Efectuar un último lavado de un minuto en agua destilada.

11º Quitar el exceso de líquido, depositar sobre el porta varias gotas de medio de montaje y cubrirlos con un cubreobjetos. Eliminar el exceso de líquido poniendo los portas entre dos papeles de filtro y ejercer una presión suave sobre los cristales para desalojar el aire atrapado entre los mismos.

12º Mirar en un microscopio con epifluorescencia. El microscopio de fluorescencia debe tener, al menos, una lámpara de 100 W para conseguir una excitación del material fluorescente óptima. Lámparas de menor potencia producen una fluorescencia más débil que hace difícil su interpretación.

Se considera que una extensión es positiva cuando se ve una fluorescencia intensa, verde-amarillenta por todo el borde de la bacteria, presentando su parte central un color verdoso oscuro no fluorescente.



#### 3.2.3.4.- Control de calidad de la inmunofluorescencia indirecta

Por cada serie de portas que se analicen, debe ponerse un control negativo y un control positivo. Como no existe controles comerciales, se utilizó como control negativo el suero anti-*B. parapertussis* marcado con isocianato de fluoresceína y como control positivo el suero anti-*B. pertussis* marcado con isocianato de fluoresceína. También se incluía un suero previamente valorado y congelado en alícuotas.

Se descartaba la serie cuando la titulación de este suero difería en más de una dilución con su valoración original, estudiándose los problemas preanalíticos y analíticos que pudieran haber concurrido a este resultado anómalo.

#### 3.2.3.5.- Sueros anti-inmunoglobulinas humanas marcados con isocianato de fluoresceína, específicos de isotipo

Una de las mayores dificultades encontradas en el montaje de las técnicas fue encontrar unos sueros que no produjeran inmunofluorescencia inespecífica. Al principio se utilizó sueros de conejo anti-IgG, anti-IgA y anti-IgM conjugados con isocianato de fluoresceína (FITC) observándose que todos los sueros estudiados eran positivos, independientemente de las diluciones de dichos sueros. Debido a este hallazgo, se realizó un ensayo utilizando únicamente los sueros de conejos, de varias casas comerciales, incubándoles con extensiones de *B. pertussis*. Todas las extensiones fueron positivas por lo que se pensó que los sueros obtenidos a partir

de conejo, o tenían anticuerpos anti-*B. pertussis*, o se producía una adsorción inespecífica del suero a la superficie bacteriana.

Con los sueros de carnero de Kallestad (I. Pasteur. Madrid) no se producía estas reacciones inespecíficas por lo que durante todo el estudio se utilizó estos sueros: anti IgG-FITC (ref.104), anti IgA-FITC (ref.102) y anti IgM-FITC (ref.105).

Cada vez que se empezaba un nuevo vial de suero se hacía una incubación del suero con una extensión de *B. pertussis* para descartar una inmunofluorescencia inespecífica. Nunca se observó esta reacción con los sueros de carnero usados hasta la actualidad.

#### 3.2.4.- Otras determinaciones

Los hemogramas se realizaron en un Coulter MAXM (Coulter,USA.) y las glucemias se analizaron en un Hitachi 717 y 747 (Boehringer Mannheim, Alemania).

#### 3.3.- Algunas consideraciones teóricas sobre el intervalo de referencia

En la práctica clínica diaria, normalmente se compara el resultado analítico obtenido del espécimen del paciente con un intervalo o rango de referencia. Este rango referencia es estimado a partir de un conjunto de valores de la magnitud biológica estudiada determinados con un procedimiento de medida definido en su totalidad y obtenidos en un grupo de individuos que cumplen unos requisitos

determinados, estando limitado por dos magnitudes denominadas límites de referencia.

Tres tipos de intervalos de referencia han sido sugeridos, dos de ellos (intervalo de tolerancia e intervalo de predicción) para distribuciones gaussianas y un tercero para distribuciones no paramétricas. Es el denominado intervalo interpercentil o interfractil definido como un intervalo de la distribución de valores de la muestra de referencia limitado por dos percentiles o fractiles. Este tipo de intervalo de referencia es el recomendado por el grupo de expertos de la Sociedad Internacional de Química Clínica. Presenta la ventaja de poder definir los intervalos de confianza de los percentiles o fractiles que limitan el intervalo de referencia, así como la facilidad de hallarlo tanto en distribuciones paramétricas como en las no paramétricas.

Teóricamente, el mínimo de muestra necesaria para estimar los percentiles  $100\alpha$  y  $100(1-\alpha)$  es igual a  $1/\alpha$ . Así, para estimar el percentil 2.5 se necesitaría, al menos,  $1/0.025$ , lo que es igual a 40 observaciones. La precisión de los percentiles o fractiles aumentan al incrementar el tamaño de la muestra, habiéndose recomendado un mínimo de 120 valores para distribuciones no paramétricas.

Se puede utilizar tres métodos para hallar la distribución o intervalo de referencia:

- Método gráfico.
- Modelo matemático basado en regresiones no lineales.
- Modelo basado en el orden creciente de los valores ("rank numbers").

En este último modelo, hay que estimar los fractiles 0.025 y 0.975 (percentiles 2.5% y 97.5%), para lo que se ordena los valores de referencia y se toma el valor con número de orden igual a  $0.025 \cdot (n+1)$ , correspondiente al fractil 0.025; el valor con el número de orden igual a  $0.975 \cdot (n+1)$  corresponderá al fractil 0.975.

Los intervalos de confianza de cada percentil o fractil se determinan a partir de una distribución binomial para un nivel de confianza de 0.10, es decir, con un 90% de seguridad. Finalmente, el límite de referencia inferior del intervalo de referencia corresponde al límite inferior del intervalo de confianza, correspondiendo el límite superior de este intervalo de referencia al límite superior del intervalo de confianza (248).

### 3.4.- Estudio estadístico

Para los estudios estadísticos se consultaron los trabajos de Jenicek y Clérout (232), Rothman (233), Armitage (249), Gardner (250), Henderson (251), Ilstrup (252) y del panel de expertos de la International Federation of Clinical Chemistry (253,254).

Los trabajos estadísticos se realizaron con el paquete SPSS/PC+, versión 4.0 (Micromouse, S.A. Madrid) y con la calculadora epidemiológica que lleva incorporado el sistema EPI5.1. Las pruebas estadísticas realizadas fueron: medias geométricas, t de Student, intervalos de confianza al 95%, poder de contraste, distribución de frecuencias, prueba de Kolmogorov-Smirnov, prueba de Chi cuadrado, prueba exacta de Fisher (cuando el número de sucesos en una casilla fue inferior a cinco), odds

ratios, prueba de Mantel Haenszel, prueba de Taylor para el cálculo del riesgo relativo, ajustes de datos a distintas ecuaciones de regresión y coeficiente de correlación de Pearson.

### 3.5.- Preparación del manuscrito

En la preparación de este manuscrito se siguieron los requisitos técnicos recomendados por el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, exceptuando lo referente a la recomendación de citar los seis primeros autores cuando éstos exceden a seis (255-258). La finalidad de citar a todos los autores que firmaron un artículo fue el no perder información sobre la magnitud e importancia del contenido. En la mayoría de las ocasiones en que ésto ocurrió, se trataba de trabajos multicéntricos e internacionales, con grandes especialistas en el tema expuesto.

## **4.- RESULTADOS**

En primer lugar, se exponen los resultados obtenidos en la muestra de referencia para definir la situación seroepidemiológica del Area Sanitaria 10, de donde fue extraída la muestra estudiada. La exposición se divide en apartados, en función de los distintos grupos de edades que integran esta cohorte y de la heterogeneidad con respecto a los niveles de anticuerpos anti-*B. pertussis*, dependiendo de:

- los niveles de anticuerpos en el nacimiento,
- las inmunizaciones recibidas durante el calendario de vacunaciones,
- el tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna,
- factores socio-ambientales, e
- infecciones subclínicas.

#### 4.1.- Serología de anticuerpos anti-*B. pertussis* en los recién nacidos

La primera pregunta que se planteó fue sobre la existencia o no de anticuerpos anti-*B. pertussis* en los recién nacidos. Si la respuesta fuera afirmativa, se tendría que conocer el isotipo de tales anticuerpos, lo que orientaría sobre su origen (infección intrauterina o transmisión placentaria de anticuerpos maternos), sus niveles séricos y su duración en el tiempo. En el caso de la tosferina no deberían encontrarse anticuerpos del isotipo IgM, puesto que esta bacteria no atraviesa la mucosa respiratoria materna, y por tanto, difícilmente llegaría al feto.

Para empezar a contestar a estas cuestiones, se analizaron 112 sangres obtenidas del cordón umbilical, así como los correspondientes especímenes de las madres de estos recién nacidos.

Se detectaron anticuerpos en 94 sangres de cordón, lo que representa una prevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* del 0.839 o, lo que es lo mismo, cerca del 84% de los recién nacidos tenían anticuerpos. En todos los casos estos anticuerpos fueron del isotipo IgG, lo que indicaba su transmisión placentaria. Como era de esperar, en ninguno de ellos se detectaron anticuerpos del isotipo IgM que pudieran señalar una infección intrauterina.

El 83% de los especímenes maternos tenían anticuerpos, del isotipo IgG y a unos niveles ligeramente inferiores a los presentados por sus respectivos hijos, no siendo la diferencia estadísticamente significativa. En la tabla 4.1 se encuentran los estadísticos que representan a las dos submuestras. Las concentraciones de anticuerpos en el recién nacido son ligeramente superiores a las concentraciones maternas, sin que ésto llegue a suponer una diferencia estadísticamente significativa

( $t = -0,62$  y  $P = 0,27$ ).

Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov a las transformaciones logarítmicas del recíproco de las diluciones para estimar la bondad del ajuste a la curva de Gauss. Se observó que la distribución de los logaritmos de las concentraciones no se ajustaba a una distribución normal, por lo que se presenta en



la tabla 4.2 la distribución de frecuencias del inverso de las diluciones. A partir de esta tabla se puede estimar la moda, representada por la dilución 1/40, y la mediana correspondiendo también a la dilución 1/40.

Tabla 4.1. Estadística descriptiva de los niveles séricos de los anticuerpos anti-*B. pertussis* en madres y sus neonatos.

Estadístico	Madres	Recién Nacidos
Media geométrica	18,62	24,54
Error.Std.media	1,41	1,38
t de Student		-0,62
P		0,27
* Log.RN = 0,29 ( $\pm 0,32$ ) + 0,87 ( $\pm 0,06$ ) log Madre (r = 0,926)		

\* Logaritmo del recíproco del título del Recién Nacido.

Tabla 4.2. Distribución de frecuencias anticuerpos anti-*B. pertussis* en recién nacidos (N = 112).

Recíproco de la dilución	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)	Frecuencia acumulada (%)
0	18	16,1	16,1
10	11	9,8	25,9
20	16	14,3	40,2
40	38	33,9	66,0
80	13	11,6	85,7
160	8	7,1	92,8
320	5	4,5	97,3
640	3	2,7	100,0
Prevalencia global de Ac.	83,9% (77,1% - 90,7%)*		
Prevalencia Ac >40.	25,9%		
Mediana	1/40		
Moda	1/40		

\* intervalo de confianza del 95%, poder de contraste 82%

#### 4.2.- Niveles de Anticuerpos anti-*B. pertussis* previos al calendario de inmunizaciones

Puesto que los anticuerpos anti-*B. pertussis* estaban presentes en un porcentaje alto de recién nacidos, era preciso conocer la evolución de estos anticuerpos de origen materno. Por motivos éticos, la evolución se estudió mediante corte transversales en neonatos y lactantes menores de tres meses que acudieron al laboratorio por otras razones. Las concentraciones de anticuerpos en el momento previo a la iniciación del calendario de inmunizaciones se consideraron basales o de referencia. Las valoraciones de la respuesta al calendario de inmunizaciones y evoluciones posteriores de los anticuerpos se hicieron con respecto a esta referencia.

Con tal fin, se agruparon los sueros estudiados en períodos de un mes, en relación con el tiempo de vida de los lactantes:

- primer grupo formado por muestras pertenecientes a los neonatos, es decir, lactantes con menos de un mes de vida.
- segundo grupo integrado por los especímenes de los lactantes con 1 mes de edad.
- tercer grupo constituido por lactantes de 2 meses de edad.

##### 4.2.1.- Niveles e isotipos de anticuerpos anti-*B. pertussis* en neonatos

El grupo estuvo formado por 44 neonatos. En ellos se detectaron anticuerpos del isotipo IgG, no evidenciándose anticuerpos del isotipo IgA, ni del isotipo IgM. La

prevalencia de anticuerpos en este grupo descendió a un 66%, observándose un 30% con títulos superiores a la dilución 1/40.

Cuando se hizo la comparación de medias con el grupo de recién nacidos, se observó una importante disminución en los títulos de anticuerpos, altamente significativa ( $t=-11,97$ ). Efectivamente, hubo una disminución de más del 86% en los títulos de anticuerpos:

$$t = -11,97 \text{ y una } P = 3 \cdot 10^{-14}.$$

En la tabla 4.3 se exponen los estadísticos que definen y comparan estos dos sub-grupo de la muestra de referencia. La tabla 4.4 contiene la distribución de frecuencias de los anticuerpos IgG pertenecientes a los neonatos.

Tabla 4.3. Estadística descriptiva de los niveles séricos de anticuerpos anti-*B. pertussis* en neonatos. Comparación con los recién nacidos.

Estadístico	Recién Nacidos	Neonatos
Media geométrica	24,55	3,31
Error.Std.media	1,38	1,17
t de Student	-11,97	
P	< $3 \cdot 10^{-14}$	

Obviamente se ha producido un descenso del título de anticuerpos como consecuencia del catabolismo de la IgG materna. Se puede observar que el título más alto corresponde a una dilución 1/80, la moda es cero y la mediana está en la dilución 1/40.

Tabla 4.4. Distribución de frecuencias de anticuerpos anti-*B. pertussis* en neonatos (N = 44).

Recíproco de la dilución	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)	Frecuencia acumulada (%)
0	15	34,1	34,1
10	3	6,8	40,9
20	3	6,8	47,7
40	10	22,7	70,4
80	13	29,6	100,0
Prevalencia global de Ac.	66,0% (52%-70%)*		
Prevalencia de Ac > 40.	29,6%		
Mediana	1/40		
Moda	0-1/80		

\*Intervalo de confianza del 95% y poder de contraste del 70%.

La seroprevalencia global descendió desde el 83.9% al 66%, produciéndose un agrupamiento bimodal. En un tercio de los lactantes no se detectaron anticuerpos; otro tercio presentaban el título 1/80 y tercio restante tuvieron titulaciones intermedias.

#### 4.2.2.- Niveles e isotipos de anticuerpos anti-*B. pertussis* en lactantes de un mes de edad

Este grupo estaba formado por 53 especímenes pertenecientes a lactantes con una edad comprendida entre el mes y los dos meses de vida. Los anticuerpos seguían siendo del isotipo IgG, con una prevalencia global del 24%, no encontrándose ningún lactante con un título de IgG superior a 1/40.

Continuó manteniéndose la disminución en los niveles de los anticuerpos como consecuencia del catabolismo de la IgG materna. La media geométrica obtenida fue de 2,00 (Er.St.  $\pm$  1,20) resultando estadísticamente diferente con la encontrada en el grupo de neonatos ( $t = -2,97$ ,  $P = 2,89 \cdot 10^{-3}$ ).

En la tabla 4.5 se expone la distribución de frecuencias, así como, los otros estadísticos que definen a este grupo. En el 75,5% de los lactantes ya no se detectaron anticuerpos anti-*B. pertussis* y en el 24,5% restante, los niveles observados fueron bajos no sobrepasando la dilución 1/40.

Teóricamente, sería a partir de esta edad y hasta la producción propia de anticuerpos por las inmunizaciones, cuando los lactantes comenzarían a estar desprotegidos y, por tanto, más predispuestos al contagio con *B. pertussis*.

Tabla 4.5. Distribución de frecuencias de anticuerpos anti-*B. pertussis* en lactantes de un mes de vida (N = 53).

Recíproco de la dilución	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)	Frecuencia acumulada (%)
0	40	75,5	75,5
10	8	15,1	90,6
20	0	0,0	90,6
40	5	9,4	100,0
Prevalencia global de Ac.	24,5%		
Prevalencia de Ac > 40.	0%		
Mediana	0		
Moda	0		

#### 4.2.3.- Niveles e isotipos de anticuerpos anti-*B. pertussis* en lactantes entre dos y tres meses de edad

En este grupo, formado por 159 lactantes, se tendrían que encontrar los niveles menores de anticuerpos anti-*B. pertussis*, en ausencia de contacto con la bacteria. Las inmunoglobulinas IgG maternas, con una vida media de 21 días, empezarían a encontrarse en sus niveles más bajos en el lactante, y, por tanto, los



anticuerpos anti-*B. pertussis* cedidos a través de la placenta. Teóricamente, este grupo de lactantes será la mejor referencia para la interpretación de las respuestas de anticuerpos a las distintas dosis de vacuna. Efectivamente, en este período de vida del individuo fue donde los niveles de los anticuerpos dirigidos contra *B. pertussis* se encontraron en su nivel más bajo. La prevalencia de anticuerpos fue del 18,3% y sólo un 8,3% de los individuos tuvieron un título igual a 1/40. En el resto de lactantes, 81,7%, no se observaron anticuerpos. Todos los anticuerpos detectados fueron del isotipo IgG, indicando el origen materno y la ausencia de contacto con *B. pertussis* (tabla 4.6).

Tabla 4.6. Distribución de frecuencias de anticuerpos anti-*B. pertussis* en lactantes de dos meses de vida (N = 159).

Recíproco de la dilución	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)	Frecuencia acumulada (%)
0	130	81,7	81,7
10	13	8,1	89,8
20	3	1,9	91,7
40	13	8,3	100,0
Prevalencia global de Ac.	18,3%		
Prevalencia de Ac > 40.	0 %		
Mediana	0		
Moda	0		

Efectuada la comparación de las medias entre los grupos de lactantes con uno y con dos meses de vida no se halló una diferencia significativa que impidiera tratar a estos dos grupos conjuntamente. La media geométrica de los anticuerpos que tenían los lactantes de dos meses de edad (1,70) fue prácticamente igual a la observada en el grupo anterior de lactantes (entre 1 y 2 meses de edad)(tabla 4.7).

Tabla 4.7. Estadística descriptiva de los niveles séricos de anticuerpos anti-*B. pertussis* en lactantes con uno y dos meses de vida.

Estadístico	1<Lactantes<2 mes	2<Lactantes<3 meses
Media geométrica	2,00	1,70
Error.Std.media	1,20	1,10
t de Student		-0,61
P		0,54

Así pues, para definir las concentraciones basales de anticuerpos dirigidos contra *B. pertussis*, previas al calendario de inmunizaciones, se puede reunir en un único grupo a los lactantes con una edad comprendida entre uno y tres (tabla 4.8). Esta seroprevalencia basal será de gran utilidad para valorar la respuesta de los lactantes a las inmunizaciones, así como la intensidad y duración de esta respuesta. La prevalencia global de anticuerpos es de un 20% y en ningún caso se supera un título superior al 1/40. El rango de referencia estimado para distribuciones no

paramétricas comprende desde el título negativo hasta la dilución 1/40, con un error alfa de 0,05 y un error beta de 0,13.

Tabla 4.8. Valores de referencia previos al calendario de inmunizaciones (N = 212).

Recíproco de la dilución	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)	Frecuencia acumulada (%)
0	170	80,2	80,2
10	21	9,9	90,1
20	3	1,4	91,5
40	18	8,5	100,0
Prevalencia global de Ac.	19,8% (14,5% - 25,1%)		
Prevalencia de Ac > 40.	0%		
Media geomét.	1,82	1,10 (Er.St.)	
Mediana	0		
Moda	0		

Intervalo de confianza del 95%. Poder de contraste del 87%.

#### 4.2.4.- Resumen de la situación humoral frente a la *B. pertussis* en los lactantes menores de tres meses

A la vista de los anteriores resultados y de los que se expondrán en el epígrafe 4.4.5. (seroprevalencia para el grupo de edad de la madre), los recién nacidos parecen presentar una prevalencia y unos niveles de anticuerpos anti-*B. pertussis* que son un fiel reflejo de la situación humoral materna frente a *B. pertussis*, expresando

únicamente el isotipo IgG, ya que solamente esta inmunoglobulina es la que atraviesa la placenta. El título de anticuerpos, así como su prevalencia, van decayendo a medida que transcurre el tiempo de vida, alcanzando el valle entre el mes y los tres meses de vida. Esta situación humoral, previa a la vacunación, parece ser la más aceptable para tomar como referencia y valorar la respuesta al calendario de inmunizaciones.

Se estimó la vida media de los anticuerpos anti-*B. pertussis* a partir de la ecuación de regresión resultante entre los logaritmos de las medias geométricas de los niveles de anticuerpos y el tiempo transcurrido, en días, hasta el inicio del calendario de vacunas, es decir, se tomaron los tiempos cero (nacimiento), 30, 60, 90 días. La ecuación que mejor se ajustó a los datos fue la ecuación de tipo recíproca:

$$\text{Log título} = 1/[0,708 (\pm 0,162) + 0,051 (\pm 0,003) \text{ días}.$$

$$r = - 0,978; r^2 = 0,956.$$

Estas estimaciones son importantes conocerlas para la planificación del comienzo del calendario de vacunas. Un comienzo precoz podría dar lugar a una escasa respuesta a las inmunizaciones por la neutralización de los antígenos de la vacuna llevada a cabo por los anticuerpos maternos todavía existentes en el lactante. Un retraso excesivo supondría aumentar el riesgo de infección por *B. pertussis*, innecesariamente. De acuerdo a esta ecuación, las concentraciones de anticuerpos anti-*B. pertussis* serían las siguientes:

- A los 15 días de vida, se hallaría el 18,9% (15,6%-24,5%) de la concentración de anticuerpos al nacer.
- A los 30 días de vida, el 11,1% (10,0%-12,6%) del nacimiento.
- A los 60 días de vida, el 7,3% (6,9%-7,7%) del nacimiento.
- A los 90 días de vida, el 6,1% (5,9%-6,3%) del nacimiento.

Por tanto, en el Area Sanitaria 10, de donde se extrajo la cohorte de estudio, el comienzo del calendario de inmunizaciones podría comenzar después del primer mes de vida. En este período de edad, alrededor del 24,5% de los lactantes tendrían anticuerpos anti-*B. pertussis* y a unos títulos que estarían comprendidos entre el 9,7% y el 12,6% de los que tenía en la sangre del cordón. Los comienzos más precoces de las vacunaciones en recién nacidos con títulos altos de anticuerpos anti-*B. pertussis* podrían ocasionar fracasos en la producción de anticuerpos (tabla 4.9).

Tabla 4.9. Evolución de los anticuerpo maternos en lactantes menores de tres meses.

Edad lactante	Seroprevalencia (I.C.)*	% Conc† (Rango)
Recién nacido	83,9% (77,1%-90,7%)	100,0%
15 días	66,0% (52,0%-70,0%)	18,9% (15,6-24,5)
30 días	24,5%	11,1% (10-12,6)
60 días	18,3%	7,3% (6,9-7,7)
90 días	19,8% (14,5%-25,1%)	6,1% (5,9-6,5)

\* I.C. Intervalo de confianza 95%.

† % con respecto a la concentración en la sangre de cordón.

#### 4.3.- Seroprevalencia, títulos e isotipos de anticuerpos anti-*B. pertussis* en lactantes incluidos en el calendario de inmunizaciones

En principio, se expondrá la respuesta de anticuerpos evocada por la vacuna en cada mes de vida del lactante, desde los tres hasta los trece meses. La finalidad de esta pormenorización no es estadística sino el que permita observar el tiempo de latencia entre cada dosis y la respuesta de anticuerpos, así como, las modificaciones de los niveles e isotipos de anticuerpos. Posteriormente, se efectuará la unión de grupos de edades que estadísticamente no se muestren diferentes. De la unión de estos grupos, se extraerán las conclusiones finales acerca del tiempo de latencia y respuesta serológica a las distintas dosis de vacuna.

##### 4.3.1.- Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en lactantes de tres meses de edad

Los lactantes con tres meses de vida van a recibir su primera dosis de vacuna trivalente (DTP) y en algunos de ellos, se comenzará a detectar una tímida respuesta de anticuerpos anti-*B. pertussis*. Los anticuerpos pertenecerán a cualquiera de los isotipo (IgG, IgA, IgM) pero a títulos bajos. En ninguno de los isotipos IgA e IgM, se llegará a alcanzar un título superior al 1/10, ni se detectarán en más del 10% de los lactantes estudiados. Como se verá a lo largo de la exposición, éstos isotipos de anticuerpos apenas van a ser estimulados por las bacterias muertas que contiene la vacuna. Esta escasa respuesta de anticuerpos de los isotipos IgA e IgM a las distintas dosis de vacuna será de gran ayuda para efectuar un diagnóstico de

pertussis, sobre todo, en este período de edad en que se va a producir una fuerte respuesta de anticuerpos IgG a las distintas dosis de vacuna (tabla 4.10). Si se produjera una infección por *B. pertussis* en los lactantes parcial o totalmente vacunados, los únicos isotipos que servirían de indicadores de infección serían la IgA y la IgM.

Tabla 4.10. Respuesta serológica a la vacuna de la tosferina en lactantes de 3 meses de edad (N = 53).

Título Anticuerpos	IgG		IgA		IgM	
	N	%	N	%	N	%
0	93	73,6	49	92,4	48	90,5
10	2	3,8	4	7,5	5	9,4
20	5	9,4				
40	7	13,2				
Seroprevalencia	26,4%		7,5%		9,4%	
Seroprev. > 1/40	0		0		0	
Media	2,34		1,17		1,23	
Mediana	0		0		0	
Moda	0		0		0	

Prácticamente, estos lactantes no se diferencian del grupo de referencia previo a las vacunaciones. Se observa un ligero incremento de la prevalencia de anticuerpos



IgG (26,4%) pero con una media geométrica estadísticamente no significativa con respecto al grupo de referencia (2,34 frente a 1,82).

#### 4.3.2.- Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en lactantes de cuatro meses

Ha transcurrido cerca de un mes desde que estos lactantes recibieron su primera dosis de vacuna. Esta dosis les ha provocado una tímida respuesta de anticuerpos, que se traduce en una mayor prevalencia y aumento de los títulos de IgG e IgM. Estos aumentos de los niveles de IgG e IgM son suficientes para mostrar una diferencia casi estadísticamente significativa con respecto al grupo de lactantes de tres meses. Efectuando la comparación de medias geométricas entre estos dos grupos, los estadísticos obtenidos son los siguientes:

IgG:  $t = -1,98$ ;  $P = 0,0503$ ;  $p < 0,1$ .

IgM:  $t = -1,81$ ;  $P = 0,075$ ;  $p < 0,1$ .

Las distribuciones características de este grupo de lactantes se encuentran reflejadas en la tabla 4.11. La seroprevalencia de anticuerpos del isotipo IgG supera el 56%, duplicando la prevalencia del grupo anterior. La IgM experimenta un comportamiento parecido en este grupo de lactantes, que con una prevalencia del 20,5% duplica la encontrada en los lactantes de tres meses de edad. Los anticuerpos del isotipo IgA, prácticamente, no se han modificado. Resumiendo, ha tenido que transcurrir un mes desde la primera inoculación para obtener una débil respuesta de anticuerpos IgG e IgM dirigidos contra los antígenos de *B. pertussis*.

Tabla 4.11. Respuesta serológicas a las inmunizaciones de tosferina entre los 4 - < 5 meses de vida (N = 39).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	17	43,6	37	94,9	31	79,5
10	9	23,1	2	5,1	7	17,9
20	12	30,8			1	2,6
40	0	0,0				
80	0	0,0				
160	0	0,0				
320	1	2,5				
Seroprevalencia	56,4%		5,1%		20,5	
Seroprev. > 1/40	2,5%		0,0%		0,0%	
Media	4,90		1,12		1,62	
Mediana	1/10		0		0	
Moda	0		0		0	

#### 4.3.3.- Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en lactantes de cinco meses

A esta edad, los niños reciben su segunda dosis de vacuna, no observándose prácticamente diferencias con el grupo anterior, si se exceptúa el comportamiento de la IgA. Esta inmunoglobulina empieza a aparecer en sangre con unos niveles bajos, como respuesta a la primera dosis de vacuna tabla 4.12. Remedando la ontogenia de las inmunoglobulinas, es el último de los isotipo en responder al estímulo antigénico provocado por la primera dosis de vacuna.

Tabla 4.12. Respuesta serológica entre los 5 - &lt; 6 meses (N = 40).

Título	IgG		IgA		IgM	
	N	%	N	%	N	%
0	24	60,0	28	70,0	32	80,0
10	2	5,0	8	20,0	1	2,5
20	5	12,5	4	10,0	7	17,5
40	5	12,5				
80	4	10,0				
Seroprevalencia	40,0%		30,0%		20,0	
Seroprev. > 1/40	10,0%		0%		0%	
Media	4,57		2,14		1,82	
Mediana	0		0		0	
Moda	0		0		0	

#### 4.3.4.- Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en lactantes de seis meses

Pasado un mes desde la segunda dosis de vacuna, ya se observa en estos niños un incremento en la intensidad de la respuesta de anticuerpos del tipo IgG, que se traduce en una seroprevalencia acusada y en títulos superiores al 1/40. El 58,2% de los lactantes tienen unos títulos de IgG superiores al 1/40 llegándose a observar títulos tan altos como los correspondientes a la dilución 1/1280. El resto de los isotipos no manifiestan variaciones significativas (tabla 4.13).

Tabla 4.13. Respuesta serológicas a las inmunizaciones de tosferina entre los 6 - < 7 meses de vida (N = 43).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	15	34,9	34	79,1	32	74,4
10	3	6,9	6	13,9	6	13,9
20	0	0,0	3	7,0	5	11,7
40	0	0,0				
80	6	14,0				
160	6	14,0				
320	7	16,3				
640	3	6,9				
1280	3	6,9				
Seroprevalencia	65,1%		20,9%		25,6%	
Seroprev. > 1/40	58,2%		0,0%		0,0%	
Media	28,84		1,70		1,95	
Mediana	1/80		0		0	
Moda	0-1/320		0		0	

#### 4.3.5.- Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en lactantes de siete meses

Se observa una consolidación de la respuesta de anticuerpos IgG en la mitad de los lactantes, mientras que en la otra mitad a penas hay respuesta.

Tabla 4.14. Respuesta serológicas a las inmunizaciones de tosferina entre los 7 - < 8 meses de vida (N = 51).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	22	43,1	39	76,5	36	70,6
10	3	5,8	8	15,7	9	17,6
20	0	0,0	4	7,8	5	9,8
40	0	0,0			1	2,0
80	7	13,7				
160	4	7,8				
320	4	7,8				
640	0	0,0				
1280	11	21,8				
Seroprevalencia	56,9%		23,5%		29,4%	
Seroprev. > 1/40	51,1%		0%		0%	
Media	26,30		1,82		2,14	
Mediana	1/80		0		0	
Moda	0-1/1280		0		0	

#### 4.3.6.- Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en lactantes de ocho meses

Al mes de finalizar el calendario de inmunizaciones primaria, se sigue manteniendo el incremento de la síntesis de anticuerpos del isotipo IgG. El resto de

los isotipos se modifican lentamente no observándose diferencias significativas con respecto a los lactantes de siete meses.

El incremento de los anticuerpos IgG anti-*B. pertussis* se traduce tanto en el aumento de su seroprevalencia, como en la elevación de sus títulos. Esto se refleja en una media geométrica superior a la del grupo anterior, estadísticamente significativa. Los estadísticos que les diferencian del grupo anterior son los siguientes:

$$t = -1,72; P = 0,088; p < 0.1.$$

En la tabla 4.15 se observan las distribuciones serológicas correspondientes a este grupo de edad.

Tabla 4.15. Respuesta serológicas a las inmunizaciones de tosferina entre los 8 - < 9 meses de vida (N = 38).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	7	18,4	30	78,9	26	68,4
10	3	7,9	7	18,4	3	7,9
20	0	0,0	1	2,7	3	7,9
40	2	5,2			6	15,8
80	7	18,4				
160	9	23,7				
320	5	13,1				
640	2	5,2				
1280	3	7,9				
Seroprevalencia	81,6%		21,1%		31,4%	
Seroprev. > 1/40	68,5%		0%		0%	
Media	61,66		1,66		2,69	
Mediana	1/160		0		0	
Moda	1/160		0		0	

#### 4.3.7.- Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en lactantes con edades comprendidas entre los nueve y trece meses

Desde un punto de vista estadístico, éste es un grupo homogéneo en el que se puede hacer un análisis descriptivo común, aunque, por las razones ya expuestas, se presentarán los datos por separado (tablas 4.16, 4.17, 4.18, 4.19).

En estos lactantes se alcanza la máxima producción de anticuerpos, aunque estadísticamente sólo se puede demostrar en los isotipos IgG e IgM. La producción de anticuerpos del isotipo IgG sigue aumentado, llegando a alcanzar su pico máximo entre los diez y doce meses de edad. A estas edades (diez, once meses), la prevalencia es del 100%. En el 70% de los lactantes los títulos de IgG son superiores al 1/40. En el 30% restante la respuesta de anticuerpos a las vacunas se puede considerar bastante débil. La función que mejor define la respuesta de anticuerpos a las distintas dosis de vacuna (entre los lactantes de 3 a 12 meses) es tipo lineal con la siguiente ecuación de regresión:

$$\text{Título Ac (Log.IgG)} = -0,84(\pm 0,07) + 0,3(\pm 0,009) * \text{Edad en meses.}$$

$$r = 0,980 \text{ (0,962 a 0,989); } r^2 = 0,961.$$

La IgM también experimenta un aumento de su prevalencia y de sus niveles, estadísticamente significativo con respecto al grupo anterior.



Los estadísticos que diferencian a este grupo con respecto al anterior (lactantes entre 8 y 9 meses de edad) son los siguientes:

IgG:  $t = -2,55$ ;  $P = 0,013$ ;  $p < 0,05$ .

IgM:  $t = -1,79$ ;  $P = 0,077$ ;  $p < 0,1$ .

Tabla 4.16. Respuesta serológica a las inmunizaciones de tosferina entre los 9 - < 10 meses de vida (N = 24).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	3	12,5	18	75,0	11	45,8
10	0	0,0	6	25,0	4	16,5
20	0	0,0			0	0,0
40	0	0,0			9	37,5
80	0	0,0				
160	4	16,6				
320	6	25,0				
640	4	16,6				
1280	7	29,2				
Seroprevalencia	87,5%		25,0%		54,2%	
Seroprev. > 1/40	87,5%		0%		0%	
Media	151,36		1,78		5,89	
Mediana	1/320		0		10	
Moda	1/1280		0		0	

Tabla 4.17. Respuesta serológicas a las inmunizaciones de tosferina entre los 10 - < 11 meses de vida (N =32).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	0	0,0	21	65,6	9	28,1
10	0	0,0	6	18,7	11	34,4
20	0	0,0	3	9,4	5	15,6
40	11	34,3	2	6,3	5	15,6
80	0	0,0			2	6,3
160	4	12,5				
320	5	15,6				
640	5	15,6				
1280	4	12,5				
2560	3	9,3				
Seroprevalencia	100,0%		34,4%		71,9%	
Seroprev. > 1/40	65,7%		0%		6,3%	
Media	223,9		2,51		8,31	
Mediana	1/320		0		10	
Moda	1/40-1/640		0		10	

Tabla 4.18. Respuesta serológicas a las inmunizaciones de tosferina entre los 11 - < 12 meses de vida (N = 22).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	0	0,0	15	68,2	9	40,9
10	0	0,0	3	13,6	4	18,2
20	0	0,0	4	18,2	5	22,7
40	5	22,7			4	18,2
80	0	0,0				
160	7	31,8				
320	10	45,4				
Seroprevalencia	100,0%		31,8%		59,1%	
Seroprev. > 1/40	77,3%		0%		0%	
Media	223,9		2,34		5,89	
Mediana	1/160		0		10	
Moda	1/320		0		0	

Tabla 4.19. Respuesta serológicas a las inmunizaciones de tosferina entre los 12 - < 13 meses de vida (N = 20).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	3	15,0	14	70,0	9	45,0
10	1	5,0	5	25,0	3	15,0
20	0	0,0	1	5,0	5	25,0
40	2	10,0			3	15,0
80	4	20,0				
160	1	5,0				
320	2	10,0				
640	4	20,0				
1280	3	15,0				
Seroprevalencia	85,0%		30,0%		55,0%	
Seroprev. > 1/40	70,0%		0%		0%	
Media	93,3		2,1		5,1	
Mediana	1/80		0		10	
Moda	1/80-1/640		0		0	

#### 4.4.- Descenso y evolución de los niveles e isotipos de anticuerpos anti-*B. pertussis* después de haber completado el calendario de vacunas

Después de aproximadamente cinco meses de haber recibido la última dosis de vacuna, y considerarse finalizado ya el calendario de vacunas de la tosferina, se va a producir un descenso progresivo de los títulos de anticuerpos. Desde un punto

de vista didáctico, estos descensos vendrán marcados por escalones correspondientes a diferencias estadísticamente significativas en la comparación de las medias geométricas de la IgG. En los otros isotipos se observan cambios en el mismo sentido, pero debido a sus bajas concentraciones, estas diferencias no aparecen como estadísticamente significativas. Por tanto, varios grupos de edades estarán agrupados bajo el mismo epígrafe, mostrándose las distribuciones de frecuencias de los títulos de anticuerpos pertenecientes a estos grupos.

De acuerdo con el criterio estadístico antes mencionado, se expondrán los siguientes apartados:

4.4.1.- grupo de edad comprendido entre los 13 meses y 4 años.

4.4.2.- grupo de edad comprendido entre los 4 y 5 años.

4.4.3.- grupo de edad comprendido entre los 5 y 10 años.

4.4.4.- grupo de edad comprendido entre los 10 y 15 años.

4.4.5.- grupo de edad comprendido entre los 15 y 90 años.

#### 4.4.1.- Niveles de anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los trece meses y los cuatro años de edad

Alcanzado el título máximo de anticuerpos, entre los nueve y doce meses, como consecuencia de haberse completado el calendario de vacunaciones, se va a producir un descenso de los títulos de anticuerpos. A los dieciocho meses edad, este descenso llega a ser, aproximadamente, del 85% para la IgG y del 50% para los

otros isotipos (tabla 4.20). Estadísticamente esta disminución aparece como significativa solamente en la IgG e IgM, a pesar de que la IgA tiene un comportamiento similar al de los otros isotipos, aunque a niveles inferiores. Esto puede ser debido a la débil respuesta de los anticuerpos del isotipo IgA frente a las inmunizaciones.

Los estadísticos que definen estas diferencias son los siguientes:

IgG:  $t = 2,82$ ;  $P = 0,006$ ;  $p < 0,01$ .

IgM:  $t = 1,92$ ;  $P = 0,059$ ;  $p < 0,10$ .

Tabla 4.20. Seroprevalencia de Anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los 13 - < 18 meses de vida (N = 60).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	24	40,0	51	85,0	41	68,3
10	9	15,0	5	8,3	9	15,0
20	3	5,0	4	6,7	3	5,0
40	3	5,0			7	11,7
80	3	5,0				
160	6	10,0				
320	5	8,3				
640	4	6,6				
1280	3	5,0				
Seroprevalencia	60,0%		15,0%		31,7%	
	(47,6-72,4%)*		(6,0-24%)*		(20,0-43,5%)*	
Seroprev. > 1/40	35,0%		0%		0%	
Media	14,8		1,5		2,5	
Mediana	1/10		0		0	
Moda	0		0		0	

\* intervalo de confianza del 95% y poder de contraste del 75%.

A partir del año y medio de edad y después del descenso referido anteriormente, los niveles de anticuerpos se van a mantener en magnitudes prácticamente estacionarias hasta los cuatro años de edad, siempre que se considere, únicamente, las medias geométricas de los títulos. Entre los 18 y 24

meses (tabla 4.21), los títulos e isotipos de anticuerpos son muy semejantes a los hallados entre los niños con edades comprendidas entre los 13 y 18 meses de vida.

Más allá de los dos años de edad, las medias geométricas de los diversos isotipos muestran un descenso parcialmente objetivable. Pero, si en lugar de estudiar una magnitud global como es una media, se observa como se distribuyen los múltiples casos que originan esta media, es decir, las seroprevalencias de los diversos títulos, entonces se marca claramente una tendencia. Tal tendencia consiste en que los niños con una edad comprendida entre los dos y tres años presentan (tabla 4.22):

1.- En lo referente a la IgG, la prevalencia global es prácticamente igual al grupo anterior (57,1% frente al 55%), pero la diferencia reside en el porcentaje de niños con títulos de IgG superiores al 1/40; a esta edad, entre los dos y tres años, solamente el 16,8% de los niños conservan una IgG con un título superior al 1/40, menos de la mitad que el grupo de edad anterior (año y medio/dos años).

2.- Con respecto a los otros dos isotipos, las prevalencias globales de anticuerpos se reducen, prácticamente, a la mitad.



Tabla 4.21. Seroprevalencia de Anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los 18 - < 24 meses de vida (N = 67).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	30	44,8	57	85,0	46	68,7
10	5	7,4	5	8,3	17	25,3
20	4	6,0	5	6,7	0	0,0
40	4	6,0			4	6,0
80	7	10,4				
160	12	17,9				
320	5	7,5				
Seroprevalencia	55,2%		15,0%		31,3%	
Seroprev. > 1/40	35,8%		0%		0%	
Media	10,7		1,5		2,2	
Mediana	1/10		0		0	
Moda	0		0		0	

Tabla 4.22. Seroprevalencia de Anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los 2 - < 3 años de vida (N = 77).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	33	42,9	71	92,2	64	83,1
10	19	24,7	6	7,8	6	7,8
20	0	0,0			3	3,9
40	12	15,6			4	5,2
80	5	6,5				
160	8	10,3				
Seroprevalencia	57,1%		7,8%		16,9%	
Seroprev. > 1/40	16,8%		0%		0%	
Media	7,1		1,2		1,6	
Mediana	1/10		0		0	
Moda	0		0		0	

En la tabla 4.23 se muestran las distribuciones de los anticuerpos correspondientes a los niños con edades comprendidas entre los tres y cuatro años. Los estadísticos de la IgG no han variado con respecto al grupo anterior. Pero, al observar la tabla de distribución de frecuencias, se aprecia un incremento en los títulos de este isotipo. El 15,4% de los niños tienen un título de IgG superior al 1/40, la mayoría de ellos con títulos comprendidos entre 1/160-1/640.

Modificaciones en este sentido (aunque menos llamativas por el tipo de respuesta de estos isotipos) ocurren con la IgA e IgM. Todos estos cambios

únicamente pueden ser ocasionados por un nuevo contacto con *B. pertussis*. En España no se suele inocular las dosis de recuerdo a los dieciocho meses y a los tres o cuatro años.

A la vista de estos resultados, la explicación más plausible sería un debilitamiento de la protección conferida por las inmunizaciones en los niños de más de tres años de edad y una infección por *B. pertussis* en, aproximadamente, el 15% de estos niños.

Estos datos aportan importantes informaciones sobre la eficacia de las vacunaciones en lo referente a la protección conferida contra la enfermedad y/o contra la infección. Más exacto sería valorar la eficacia del calendario de vacunaciones con respecto al tiempo transcurrido desde la última inoculación, que no hablar de una eficacia global en un grupo amplio de edades, como pudiera ser hasta los doce años. En el capítulo de la discusión se volverá sobre este importante punto de la eficacia de las vacunaciones con vacunas de *B. pertussis*. Por el momento, podemos adelantar que a los dos años de finalizar el calendario de inmunizaciones, la eficacia de la vacuna ya no es del 100%, al menos en lo referente a la infección por *B. pertussis*.

Tabla 4.23 años. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los 3 - < 4 años de vida (N = 124).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	51	41,1	101	81,4	94	75,8
10	28	22,6	12	9,7	15	12,1
20	5	4,0	4	3,2	5	4,1
40	21	16,9	0	0,0	10	8,1
80	2	1,6	3	2,5		
160	5	4,0	4	3,2		
320	6	4,9				
640	6	4,9				
Seroprevalencia	58,9%		18,6%		24,2%	
Seroprev. > 1/40	15,4%		5,7%		0%	
Media	8,3		1,9		2,0	
Mediana	1/10		0		0	
Moda	0		0		0	

#### 4.4.2.- Niveles de anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los cuatro y cinco años de edad

Este grupo de edad muestra unas características especiales que le hace diferente de los grupos de edades anterior y posterior. Por un lado, las concentraciones y seroprevalencia global de IgG siguen descendiendo, alcanzándose unos de los niveles más bajos post-vacunales encontrados en este isotipo a lo largo

de la vida de un individuo. Descenso que es estadísticamente significativo con respecto al grupo de edad anterior. Los estadísticos que marcan esta diferencia son:

$$t = 3,14; P = 0,0017 \text{ y } p < 0,01.$$

Por otro lado, al igual que en el grupo anterior, se sigue observando que alrededor del 10% de los niños de esta edad han perdido la protección adquirida por las vacunaciones, como se puede deducir por los incrementos en los títulos de los anticuerpos a consecuencia de infecciones por *B. pertussis*. Algunos niños presentan títulos de anticuerpos muy importantes, más altos que los obtenidos después de completar el calendario de vacunas, como corresponde a una respuesta humoral secundaria. Tal es el caso de la IgG que llega a ser positiva a la dilución 1/2580, o de la IgA con títulos de 1/80 a 1/640, o de la IgM con diluciones de 1/80 y 1/160 (tabla 4.24).

Tabla 4.24. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los 4 - < 5 años de vida (N = 180).

Título Anticuerpos	IgG		IgA		IgM	
	N	%	N	%	N	%
0	114	63,3	158	87,7	124	68,9
10	25	13,9	12	6,7	27	15,0
20	5	2,8	0	0,0	8	4,4
40	17	9,4	0	0,0	14	7,8
80	9	5,0	3	1,7	3	1,7
160	3	1,7	4	2,2	4	2,2
320	5	2,8	0	0,0		
640	0	0,0	3	1,7		
1280	0	0,0				
2560	2	1,1				
Seroprevalencia	36,7%		12,3%		31,1%	
	(29,7-43,7%)*		(7,5-17,1%)*		(24,3-37,9%)*	
Seroprev. > 1/40	10,6%		5,6%		3,9%	
Media	4,5		1,5		2,6	
Mediana	0		0		0	
Moda	0		0		0	

\* intervalo de confianza del 95% y poder del 85.5%

#### 4.4.3.- Niveles de anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los cinco y diez años de edad

Este grupo se va a caracterizar por un incrementos en los títulos de la IgG.

Estos aumentos de los títulos de IgG son debidos a nuevos contactos con *B.*

*pertussis*, que se venían evidenciando desde los tres años de edad, como consecuencia del debilitamiento progresivo que se está produciendo de la inmunidad humoral conferida por las vacunas. El 19 % de los niños que componen este grupo van a presentar títulos de IgG superiores al 1/40. Las diferencias en las concentraciones de IgG con respecto al grupo anterior son estadísticamente significativas:

$$t = 2,95; P = 0,003; p < 0,01.$$

Estos contactos con *B. pertussis* se van a manifestar, también, en los títulos altos del serotipo IgM. El 7,7% de los niños tienen unos títulos de IgM superiores a la dilución 1/40 (tabla 4.25).

Tabla 4.25. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los 5 - < 10 años de vida (N = 317).

Título Anticuerpos	IgG		IgA		IgM	
	N	%	N	%	N	%
0	168	53,0	306	96,5	248	78,2
10	29	9,2	5	1,6	14	4,4
20	27	8,5	3	0,9	10	3,1
40	32	10,1	3	0,9	21	6,6
80	11	3,5			24	7,7
160	15	4,7				
320	16	5,0				
640	9	2,8				
1280	10	3,2				
Seroprevalencia	47,0%		3,5%		21,8%	
	(41,5-52,5%)*		(1,5-5,5%)*		(17,3-26,3%)*	
Seroprev. > 1/40	19,2%		0%		7,7%	
Media	6,9		1,1		2,2	
Mediana	0		0		0	
Moda	0		0		0	

\* intervalo de confianza del 95% y poder del 89%

#### 4.4.4.- Niveles de anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los diez y quince años de edad

Entre los diez y quince años, las seroprevalencias y títulos de anticuerpos dirigidos contra *B. pertussis* se encuentran en sus niveles más bajos. Sólo se detectan anticuerpos en un 20%, aproximadamente, de estos niños, estando en la



mitad de ellos a niveles comparables al período previo al comienzo del calendario de inmunizaciones. Entre el 2,3% y el 4,1% de los niños de este grupo cumplirán con los criterios serológicos de tosferina. Resumiendo, los niños con edades comprendidas entre los diez y los quince presentan los niveles de anticuerpos dirigidos contra *B. pertussis* más bajos de todos los grupos de edades anteriores. La inmunidad post-vacunal o post-infecciosa se encuentra muy debilitada frente a *B. pertussis* (tabla 4.26).

Estadísticamente se puede demostrar una diferencia significativa con respecto al grupo de edad anterior (5 - 10 años):

IgG:  $t = -6,03$ ;  $P = 0,0000$ ;  $p < 0,001$ .

IgM:  $t = -3,55$ ;  $P = 0,0004$ ;  $p < 0,001$ .

Tabla 4.26. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los diez y quince años de edad (N = 315).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	241	76,5	310	98,4	289	91,7
10	17	5,4	5	1,6	13	4,1
20	13	4,1			2	0,6
40	10	3,2			4	1,3
80	12	3,8			3	1,0
160	9	2,9			4	1,3
320	6	1,9				
640	7	2,2				
Seroprevalencia	23,5%		1,6%		8,3%	
	(18,8-28,2%)*		(0,3%-2,9%)*		(5,3-11,3%)*	
Seroprev. > 1/40	10,6%		0%		2,3%	
Media	2,5		1,1		1,3	
Mediana	0		0		0	
Moda	0		0		0	

\* intervalo de confianza del 95% y poder del 89%.

#### 4.4.5.- Niveles de anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los quince y noventa años de edad

No existen diferencias en los sujetos que forman este amplio grupo de edad en lo referente a la serología de *B. pertussis*, a pesar de ser un grupo heterogéneo con respecto al calendario de vacunaciones con *B. pertussis*. Es heterogéneo porque prácticamente todos los sujetos con más de 25 años de edad no han podido recibir las tres dosis de vacuna que completan el calendario de inmunizaciones. A pesar de estas diferencias en las inmunizaciones con bacterias muertas, el estado humoral observado frente a *B. pertussis* es similar en todos los individuos. No obstante, se exponen en las tablas 4.27, 4.28 y 4.29 las distribuciones correspondientes a los grupos de edades comprendidas entre los 15-20 años, 20-25 años y 25-90 años. Estadísticamente, no se puede observar ninguna diferencia significativa entre estos grupos. Todos se caracterizan por la alta prevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* del isotipo IgG, alrededor de un 65%, y, sobre todo, lo más llamativo son los títulos de dicho isotipo. Entre un 40 y 60% de los sujetos van a tener títulos de IgG superiores al 1/40, lo que parece indicar una alta tasa de contactos entre *B. pertussis* y estos sujetos. Infecciones atípicas, subclínicas, o silentes, que parecen más intensas entre los 15 y 20 años, en donde casi el 60% de los individuos que componen este segmento de edad tienen títulos de IgG superiores al 1/40

Otro hecho que despierta interés y plantea interrogantes es la ausencia de anticuerpos del isotipo IgA en los individuos mayores de 25 años.

Tabla 4.27. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los quince y veinte años de edad (N = 96).

Título Anticuerpos	IgG		IgA		IgM	
	N	%	N	%	N	%
0	33	34,4	91	94,8	88	91,7
10	3	3,1	5	5,2	5	5,2
20	2	2,1			3	3,1
40	2	3,1				
80	17	17,7				
160	21	21,9				
320	7	7,3				
640	8	8,3				
1280	3	3,1				
Seroprevalencia	65,6%		5,2%		8,3%	
Seroprev. > 1/40	58,3%		0%		0%	
Media	26,3		1,1		1,2	
Mediana	1/80		0		0	
Moda	0-1/160		0		0	

Tabla 4.28. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los veinte y veinticinco años de edad (N = 113).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	41	36,3	107	94,7	98	86,7
10	5	4,4	0	0,0	5	4,4
20	8	7,1	0	0,0	3	2,6
40	4	3,5	0	0,0	7	6,3
80	21	18,6	0	0,0		
160	19	16,8	6	5,3		
320	11	9,8				
640	4	3,5				
Seroprevalencia	63,7%		5,3%		13,3%	
Seroprev. > 1/40	48,7%		5,3%		0%	
Media	18,2		1,3		1,5	
Mediana	1/40		0		0	
Moda	0		0		0	

Tabla 4.29. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en sujetos mayores de veinticinco años de edad (N = 510).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	162	31,7	510	100,0	454	89,0
10	21	4,1			20	3,9
20	9	1,7			27	5,3
40	112	22,0			9	1,8
80	57	11,2				
160	59	11,6				
320	59	11,6				
640	24	4,7				
1280	7	1,4				
Seroprevalencia	68,3%		0%		11,0%	
Seroprev. > 1/40	40,5%		0%		0%	
Media	22,4		0		1,4	
Mediana	1/40		0		0	
Moda	0		0		0	

#### 4.5.- Resumen de la situación humoral frente a *B. pertussis* en el grupo control

La seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* se podría resumir en seis grandes grupos, bastante diferentes entre sí. Por supuesto, estas diferencias son mucho más notorias en los anticuerpos del isotipo IgG, seguidas por las del isotipo IgM. Prácticamente, no se manifiestan en el isotipo IgA por su escasa producción en

respuesta a las vacunaciones, hecho que será gran utilidad en algunos grupos de edad a la hora de efectuar un diagnóstico serológico de tosferina. Estos grandes grupos o apartados serán los siguientes:

4.5.1.- Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en recién nacidos y neonato.

4.5.2.- Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* previos al calendario de inmunizaciones.

4.5.3.- Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en respuesta a las distintas dosis de vacunas.

4.5.4.- Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* post-vacunales.

4.5.5.- Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en la infancia.

4.5.6.- Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en los adolescentes y adultos.

4.5.1.- Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en recién nacidos y neonatos

Este grupo está representado por la seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* al nacer. En este apartado se incluyen, por un lado los especímenes de sangre de cordón, y por el otro lado, los especímenes séricos correspondientes a los lactantes con menos de un mes de vida. Ambos grupos presentan diferencias significativas que impiden unificarlos en un grupo único. Por tanto, tienen entidad propia para ser tratados por separados y como tal se hizo en los apartados 4.1 y 4.2.1.

Aunque el número de lactantes menores de 1 mes no es excesivamente amplio como para que las conclusiones extraídas de sus resultados alcancen los objetivos propuestos (un poder de las estimaciones superiores al 80%) parece interesante exponer la información que aportan estos estadísticos, siguiendo el pensamiento de la OMS de que más vale acertar con aproximación que equivocarse con precisión.

#### 4.5.2.- Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* previos al calendario de inmunizaciones

Este grupo lo forman los lactantes con una edad comprendida entre el mes y los tres meses. En ellos, los niveles de anticuerpos son muy similares, por lo que se pueden considerar como un grupo único constituido por 212 especímenes. El 80% de los lactantes de este grupo carecen de anticuerpos y en el 20% restante los títulos de anticuerpos no superan la dilución 1/40. A partir de la seroprevalencia de este grupo se estima el rango de referencia previo al calendario de vacunaciones. El fractil 0,95 abarca desde la ausencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* hasta la dilución 1/40. Por supuesto, lo anterior es válido para el isotipo IgG. Los otros isotipos no se detectan en este grupo de edad (tabla 4.30).



Tabla 4.20. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* previos al calendario de inmunizaciones.

Título Anticuerpos	IgG		IgA		IgM	
	N	%	N	%	N	%
0	170	80,2				
10	21	9,9				
20	3	1,4				
40	18	8,5				
Seroprevalencia	19,8%					
	(14,4-25,2%)*					
Seroprev. > 1/40	0					
Media	1,78					
Mediana	0					
Fractil 0.95	1/40					

\* intervalo de confianza del 95% y poder del 87%

#### 4.5.3.- Seroprevalencia de los anticuerpos anti-*B. pertussis* durante el período de inmunizaciones

En estos períodos de inmunizaciones se van a producir incrementos de los títulos de anticuerpos en respuesta a cada dosis de vacuna. Por lo tanto, habrá que considerar tres períodos bien definidos, correspondientes a la respuesta a cada

inmunización. Tal respuesta se observará, principalmente, al mes de la inoculación con las bacterias muertas en los isotipos IgG e IgM. La respuesta a la primera dosis de vacuna es escasa, apenas duplicando el título basal.

En la tabla 4.31 se encuentra la distribución de los anticuerpos encontrados en los lactantes con un período de vida comprendido entre los cuatro y seis meses. Algunos de los lactantes de este grupo habrán recibido su segunda dosis de vacuna, aunque la respuesta de anticuerpos que se observará, será la correspondiente a la primera dosis. No ha transcurrido el tiempo suficiente para que la segunda dosis de vacuna haya provocado una respuesta de anticuerpos.

Se empiezan a evidenciar anticuerpos del isotipo IgA e IgM en pequeñas cantidades. El fractil correspondiente al 0.95 está en la dilución 1/80 para la IgG, y 1/10, 1/20 para la IgA e IgM, respectivamente.

Tabla 4.31. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* correspondientes a una dosis de vacuna (N = 79).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	41	51,9	65	82,2	63	79,8
10	11	13,9	10	12,7	8	10,1
20	17	21,5	4	5,1	8	10,1
40	5	6,3				
80	4	5,1				
160	0	0,0				
320	1	1,3				
Seroprevalencia	48,1%		17,8%		20,2%	
	(37,1-59,1%)*		(9,4-26,2%)*		(11,3-29,1%)*	
Seroprev. > 1/40	6,4%		0%		0%	
Media	4,46		1,55		1,70	
Mediana	1/40		0		0	
Fractil 0.95	1/80		1/10		1/20	

\* intervalo de confianza del 95% y poder del 78%

El segundo período está formado por 94 niños entre 6 y 8 meses de edad, algunos de los cuales, acaban de recibir la tercera dosis de vacuna pero todavía no han tenido tiempo para fabricar una respuesta humoral a esta tercera dosis de vacuna. Por consiguiente, los niveles de anticuerpos encontrados en este período de

edad son los evocados por dos estímulos con bacterias muertas. La respuesta es más marcada, siendo casi seis veces superior a la respuesta obtenida tras la primera dosis. En este momento, después de las dos dosis de vacunas, los títulos de anticuerpos se pueden considerar importante en más de la mitad de los niños. Casi el 60% de ellos tienen títulos de IgG superiores al 1/80, siendo en el 15% de los lactantes muy altos, 1/1280. Los niveles de anticuerpos de los isotipos IgA e IgM apenas se han modificado. En la tabla 4.32 se pueden consultar los niveles e isotipos de anticuerpos encontrados después de la segunda estimulación con bacterias muertas.

El tercer período está constituido por 136 niños, entre 8 y 13 meses de edad, que han completado el calendario de vacunas. En esta edad se van a hallar los títulos de anticuerpos más altos como respuesta a las inmunizaciones, superando en más de 4 veces las concentraciones alcanzadas en respuesta a la segunda dosis. La ecuación de regresión que define el incremento del logaritmo del título de anticuerpos del isotipo IgG en respuesta a las distintas dosis de vacuna (entre los 120 días y 360 días de vida del lactante) es de tipo lineal:

$$\text{Log título IgG} = -0,837(\pm 0,076) + 0,04(\pm 0,0003)\text{edad en días.}$$

$$r = 0,980 (0,962-0,989); r^2 = 0,961.$$

A partir de este momento, los títulos de anticuerpos van a disminuir paulatinamente y únicamente se elevarán como respuesta a un nuevo estímulo antigénico. Este nuevo estímulo antigénico, en nuestro país, casi siempre, salvo raras

---

excepciones, suele corresponder a una infección por *B. pertussis*, ya que no es habitual administrar la cuarta dosis de recuerdo a los doce meses de la tercera dosis de vacuna. En la tabla 4.33 presentamos la distribución de anticuerpos encontrada en nuestra serie de 136 niños con edades comprendidas entre los ocho y trece meses de edad. En el 27,2% de los niños la respuesta de anticuerpos es escasa, no superándose la dilución 1/40.

Tabla 4.32. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* correspondientes a dos dosis de vacuna (N = 94).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	37	39,4	73	77,7	68	72,3
10	6	6,4	14	14,9	15	16,0
20	0	0,0	7	7,4	10	10,6
40	0	0,0			1	1,1
80	13	13,8				
160	10	10,6				
320	11	11,7				
640	3	3,2				
1280	14	14,9				
Seroprevalencia	60,6%		22,3%		27,7%	
	(50,7-70,5%)*		(13,9-30,7%)*		(18,7-36,7%)*	
Seroprev. > 1/40	54,2%		0%		0%	
Media	28,84		1,73		2,04	
Mediana	1/80		0		0	
Fractil 0.95	1/1280		1/20		1/20	

\* intervalo de confianza del 95% y poder del 80%.

Tabla 4.33. Seroprevalencia después de 3 dosis de vacuna (N = 136).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	13	9,6	98	72,1	64	47,1
10	4	2,9	27	19,8	25	18,4
20	0	0,0	9	6,6	18	13,2
40	20	14,7	2	1,5	27	19,8
80	11	8,1			2	1,5
160	25	18,4				
320	28	20,6				
640	15	11,0				
1280	17	12,5				
2560	3	2,2				
Seroprevalencia	90,4%		27,9%		52,9%	
	(85,5-95,3%)*		(20,4-35,4%)*		(44,6-61,2%)*	
Seroprev. > 1/40	72,8%		0%		1,5%	
Media	128,82		2,04		5,01	
Mediana	1/160		0		1/10	
Fractil 0.95	1/1280		1/20		1/40	

\* intervalo de confianza del 95% y poder del 82%.

#### 4.5.4.- Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los trece meses y cuatro años de edad

A partir de los trece meses de edad se va a producir un descenso importante de los anticuerpos elaborados en respuesta al calendario de vacunas. Esta disminución se observa en todos los isotipos, aunque, naturalmente, es mucho más notoria en el isotipo IgG y en los seis meses que siguen al pico máximo de anticuerpos (tabla 4.20). Al igual que ocurría con la IgG materna, la ecuación de regresión que mejor define el catabolismo de la IgG post-vacunal entre los trece meses de edad y los cuatro años, es una ecuación de tipo recíproco:

$$\text{Log IgG} = 1/[0,358 (\pm 0,049) + 0,57 (\pm 0,03) \text{ meses}.$$

$$r = 0,921 ; r^2 = 0,848.$$

Como corresponde a una ecuación de este tipo, a partir de los 18 meses de edad y hasta los cuatro años, los títulos de anticuerpos van a seguir descendiendo muy lentamente. Estadísticamente no se puede demostrar una diferencia significativa en el título de anticuerpos de este segmento de edad.

La seroprevalencia global de la IgG se va a mantener prácticamente inalterada a lo largo de este período, entre un 55 y un 60%. Lo que sí se va a alterar son sus títulos. Después de los dos años de edad, el porcentaje de niños con títulos de IgG superiores al 1/40 disminuye a la mitad de los encontrados entre los 13 y los 24 meses (de un 35% a un 16%, respectivamente). La misma tendencia se observa en



las seroprevalencias de IgA e IgM, siendo éstas prácticamente la mitad de las encontradas en el período comprendido entre los 13 y 24 meses de edad (tabla 4.34).

Es necesario resaltar un hecho importante que pudiera quedar enmascarado, o por lo menos pasar desapercibido, en el global de los datos expuestos en la tabla 4.34. Este hecho se refiere a los altos títulos de la IgG, superiores al 1/160 (6.3% de este grupo) y de IgA, superiores al 1/40 (2.6%). Esto, únicamente puede ser la consecuencia de una infección por *B. pertussis*, dado lo inhabitual de la administración de una dosis de recuerdo y la ausencia de respuesta del isotipo IgA al estímulo vacunal. Para poder objetivar de una forma clara lo expuesto anteriormente hay que remitirse a las tablas 4.22 (seroprevalencia de anticuerpos entre los 2-3 años) y 4.23 (seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los 3 y 4 años). Comparando las dos tablas podemos observar que entre los niños de tres años hay un 9,7% [4,5%-14,9% (intervalo de confianza al 95% y seguridad del 83%)] de ellos que presentan anticuerpos IgG superiores al 1/160; este título es lo máximo encontrado en el período de edad anterior, dos años. La IgA muestra un comportamiento similar, en el 8,9% (3,9% y 13,9%) de los niños aparece un título de anticuerpos superior al grupo de edad anterior.

Así pues, como resumen de este grupo constituido por niños con edades comprendidas entre los 13 meses y los cuatro años de edad, podemos decir que se va produciendo un descenso progresivo de los anticuerpos, con un escalón más acusado entre los 13 y los 18 meses de edad. A partir de los tres años de edad, se

podrá observar en un grupo reducido de niños (alrededor del 10%) una serología de pertussis compatible con una infección clínica o subclínica.

Tabla 4.34. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los dieciocho meses y hasta los cuatro años de edad (N = 268).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	114	42,5	229	85,5	204	76,1
10	52	19,4	23	8,6	38	14,2
20	9	3,4	9	3,3	8	3,0
40	37	13,8	0	0,0	18	6,7
80	14	5,2	3	1,1		
160	25	9,3	4	1,5		
320	11	4,1				
640	6	2,2				
Seroprevalencia	57,4%		14,6%		23,9%	
	(52,1-62,7%)*		(10,8-18,4%)*		(19,6-28,2%)*	
Seroprev. > 1/40	20,9%		2,6%		0%	
Media	8,70		1,53		1,93	
Mediana	10		0		0	

\* intervalo de confianza del 95% y poder del 88%.

#### 4.5.5.- Seroprevalencia de los anticuerpos anti-*B. pertussis* entre los 4 y los quince años de edad. Estimación del intervalo de referencia

En este apartado se incluye una serie de grupos que presentan entidad propia como para ser tratados por separado. La serie de grupos que integran este apartado son:

- niños con edades entre los 4 y 5 años, apartado 4.4.2.
- niños con edades entre los 5 y 10 años, apartado 4.4.3.
- niños con edades entre los 10 y 15 años, apartado 4.4.4.

No se volverá a repetir lo dicho con respecto a estos grupos en los apartados antes citados. Únicamente, y como compendio de estas edades, destacar el descenso progresivo de la seroprevalencia de anticuerpos, alcanzándose el nadir entre los 10 y los 15 años. En estas edades, el 76,5% de los niños no presentan anticuerpos detectables. Un segundo punto a resaltar es el 10%, aproximadamente, de infecciones serológicas que se producen en todos estos grupos. Infecciones que se objetivizan bien por un título de IgG superior al 1/160., o de IgA o IgM superiores al 1/10 y 1/40, respectivamente.

#### 4.5.6.- Rangos de referencia de los anticuerpos anti-*B. pertussis* posteriores al calendario de vacunaciones

Se han utilizado los niños con edades comprendidas entre los dos años y los quince años para estimar el rango de referencia ( $N = 1.013$ ). No se excluyó ningún niño con serología compatible de infección por *B. pertussis* (objetivable en función de los isotipos IgA e IgM) porque estos casos representaron una mínima parte del total de sujetos. Teóricamente, aunque la inclusión de las infecciones eleva el límite de referencia, restando sensibilidad y aumentando la especificidad de la prueba, la utilidad práctica de la referencia se sigue manteniendo. Las infecciones, en general, suelen provocar una respuesta de anticuerpos lo bastante intensa para superar ampliamente el límite superior del rango de referencia.

Hechas estas salvedades y utilizando el método no paramétrico para la estimación del rango de referencia, con un intervalo de confianza del 95% y una seguridad del 90%, el rango estimado es :

Isotipo IgG 1/160.

Isotipo IgA 1/10.

Isotipo IgM 1/40.

#### 4.5.7.- Seroprevalencia de los anticuerpos anti-*B. pertussis* en personas mayores de 15 años

Este grupo está constituido por un grupo heterogéneo de personas desde el punto de vista del calendario de vacunaciones. Los sujetos nacidos antes de 1965 no recibieron ninguna dosis de vacuna contra la tosferina. De los nacidos después de este año, los sujetos comprendidos entre los 20 y 28 años, posiblemente no estén protegidos por los programas de vacunación, aunque hayan podido recibir alguna inmunización. No obstante, desde el punto de vista serológico contra *B. pertussis*, todos estos individuos se pueden considerar como un grupo homogéneo y como tal serán tratados.

Lo más llamativo de este grupo es el gran número de personas con anticuerpos circulantes detectables. El 67,2% de los 719 sujetos que integran este grupo tienen anticuerpos del isotipo IgG; en el 1,5% y 11% se encontrarán anticuerpos del isotipo IgA e IgM, respectivamente (tabla 4.35).

Utilizando los intervalos de referencia para estimar el número de sujetos que se encuentran por encima de los mismos, y, por consiguiente (desde un punto de vista del diagnóstico serológico) han tenido una infección por *B. pertussis*, se observan que 129 de los 719 personas (17,9%) cumplen con el criterio serológico de pertussis. Volveremos sobre este importante punto en la discusión, cuando se aborde el tema de la pertussis en los adultos y el papel de éstos como reservorio y transmisores de la enfermedad.

Tabla 4.35. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en personas mayores de 15 años (N = 719).

Título	IgG		IgA		IgM	
Anticuerpos	N	%	N	%	N	%
0	236	32,8	708	98,5	640	89,0
10	29	4,0	5	0,7	30	4,2
20	19	2,6	0	0,0	33	4,6
40	118	16,4	0	0,0	16	2,2
80	95	13,2	0	0,0		
160	99	13,8	6	0,8		
320	77	10,7				
640	36	5,0				
1280	10	1,5				
Seroprevalencia	67,2%		1,5%		11,0%	
	(63,8-70,6%)*		(0,6-2,4%)*		(8,8-13,2%)*	
Seroprev. > 1/40	44,2%		0,8%		0%	
Media	1,34		0,006		0,14	
Mediana	40		0		0	
Fractil 0.95	640		10		20	

\* intervalo de confianza del 95% y poder del 93%.

#### 4.5.8.- Tasa de prevalencia de tosferina serológica en la muestra de referencia

Para finalizar el apartado correspondiente a la serología de la pertussis en la muestra de referencia, se incluye la tabla 4.36. en donde se representa las tasas de

prevalencia serológicas de pertussis (por 100 habitantes) en los distintos grupos de edades, teniendo en cuenta un único serotipo o el conjunto de ellos para efectuar el diagnóstico serológico de pertussis. El intervalo de confianza utilizado es el 95%, variando la seguridad de los intervalos (poder de contraste) según el número de sujetos de cada grupo.

Las mayores tasas corresponden a los grupos de edades comprendidas entre los cinco y diez años, tres a cuatro años y los mayores de quince años. Las menores tasas se encuentran en el grupo con edades comprendidas entre los diez-quince y los cuatro-cinco años. Parece ser que a partir de los tres años, la inmunidad conferida por la vacuna se va debilitando en algunos niños, perdiéndose la inmunidad, al menos, contra la infección. La consecuencia sería una tosferina subclínica o clínicamente atípica, de difícil diagnóstico y fuente de diseminación y actitudes terapéuticas equivocadas. De todo esto se podría deducir que la inmunidad conferida por la vacuna se empezaría a desvanecer en el 10% -20% de los niños mayores de tres años.

Las tasas más bajas del serodiagnóstico de pertussis se ven en los niños con edades comprendidas entre los diez y los quince años.

Tabla 4.36. Tasas de prevalencia en la cohorte control con diagnóstico serológico de tosferina.

N* (edad)†	IgG (%) I.C‡. 95%	IgA (%) I.C‡. 95%	IgM (%) I.C‡. 95%	Global(%) I.C‡. 95%	Poder
124 (3-4)	12 (9,7%) 4,5-14,9%	11 (8,9%) 3,8-14,0%		23 (18,5%) 11,5-25,5%	83%
180 (4-5)	7 (3,9%) 1,0-6,8%	10 (5,6%) 2,2-9,0%	7 (3,9%) 1,0-6,8%	24 (13,3%) 8,2-18,4%	85%
317 (5-10)	35 (11%) 7,5-14,5%	6 (1,9%) 0,4-3,4%	24 (7,6%) 4,6-10,6%	65 (20,5%) 16-25%	89%
315 (10-15)	13 (4,1%) 1,9-6,3%		7 (2,2%) 0,6-3,8%	20 (6,3%) 3,6-9,0%	89%
719 (>15)	123 (17,1) 14,0-19,9%	6 (0,8%) 0,1-1,5%		129 (17,9%) 15,0-20,8%	93%

\* Número de sujetos que forman el grupo de edad.

† Edad en años.

‡ I.C (Intervalo de confianza 95%).



#### 4.6.- Cohorte de Referencia. Concentraciones e isotipos de anticuerpos anti-*B. pertussis* en saliva

Se estudiaron los niveles e isotipos de anticuerpos en la saliva de 261 sujetos con edades comprendidas entre los tres meses y los 77 años. Se detectaron anticuerpos en 43 personas (16,5%), quince de las cuales eran niños (34,9%) y el resto adultos.

Los niveles de anticuerpos oscilaron entre las diluciones 1/2 y 1/16 no guardando ninguna relación con los niveles e isotipos de los anticuerpos séricos que pudiera tener el sujeto. En 35 especímenes (81%), el isotipo encontrado fue IgA a unos niveles que no superaron la dilución 1/8. En el 19% restante, los anticuerpos fueron del isotipo IgG a unos títulos superiores a los encontrados en el isotipo IgA, pero no superando la dilución 1/16.

#### 4.7.- Características de la cohorte remitida para el estudio de pertussis

La muestra remitida con sospecha de pertussis está integrada por 162 sujetos con edades comprendidas entre un mes y los 77 años. De estos 162 sujetos, en 51 de ellos (31,5%) se cumplían los criterios serológicos para hacer el diagnóstico de pertussis y todos eran menores de quince años. La distribución de estos 51 casos con serología positiva fue similar entre los dos sexos, 25 niñas y 26 niños.

Se estudió la posible asociación que pudiera producirse entre la demanda de estudio y el sexo del sujeto. Para ello, se efectuó una prueba de Chi cuadrado con corrección de Mantel-Haenszel y se halló la odds ratio con el límite de confianza de Cornfield al 95%. Los estadísticos encontrados fueron:

$$\text{Chi}^2 = 0,02. P = 0,89.$$

$$\text{Odds ratio} = 1,05 (0,51-2,16).$$

Con estos datos no se puede afirmar que existe asociación entre el sexo del sujeto, la demanda, o los resultados positivos o negativos.

#### 4.7.1.- Distribución de las peticiones por grupos de edades

Los grupos de edad, en donde se demandaron más estudios, fueron los comprendidos entre los 5 y los 10 años (29,6% de todas las peticiones), y el grupo de lactantes con menos de 6 meses de edad (28,3% sobre el global de las peticiones). Los grupos integrados por niños entre 3 y 5 años y 10 a 15 años representaron el 16,7% y el 12,3%, respectivamente. Esta demanda se corresponde con los grupos de edades en los que el diagnóstico serológico positivo de pertussis fue mayor. Así, si estudiamos la distribución de los casos positivos, vemos que éstos se concentran en los mismos grupos de edades arriba mencionados, aunque la prioridad de los grupos no sea la misma. El 45,1% de los casos positivos van corresponder al grupo de edad comprendido entre los cinco y los diez años, seguido por el grupo con edades comprendidas entre los 10-15 años (19,6%), menores de

seis meses (17,6%) y 3 a 5 años con un 13,7%. Exceptuando un serodiagnóstico de positivo de pertussis en un lactante de siete meses, no se detecto ningún otro caso positivo entre los seis meses de edad y los dos años (tabla 4.37).

Tabla 4.37. Distribución por grupo de edades de las peticiones y estudios serológicos positivos de pertussis.

Edad paciente.	Peticiones (%)	Diagnóstico serológico pertussis positivos (%).
0-6 meses	46 (28,3%)	9 (17,6%)
6-12 meses	3 (1,8%)	1 (2,0%)
1-2 años	3 (1,8%)	0 (0,0%)
2-3 años	4 (2,5%)	1 (2,0%)
3-5 años	27 (16,7%)	7 (13,7%)
5-10	48 (29,6%)	23 (45,1%)
10-15 años	20 (12,3%)	10 (19,6%)
> 15 años	11 (6,8%)	0 (0,0%)

Se estudió el porcentaje de concordancia entre el diagnóstico clínico de presunción y la confirmación por el laboratorio. De estos datos se podría deducir la dificultad del clínico en efectuar un diagnóstico dependiendo de la edad del paciente. Excluyendo los grupos de edades en donde el número de sujetos es pequeño, se observó que el menor porcentaje de "aciertos" se produjo en los menores de seis meses. En honor a la verdad hay que decir, que aparte de la dificultad intrínseca que este grupo de edad pueda tener, estos lactantes pequeños generan respuestas

rápidas en los facultativos. Es decir, el facultativo, más que pensar en un diagnóstico de presunción, seguramente, lo que realizó es un diagnóstico de exclusión para llegar, lo más rápidamente posible, a un diagnóstico y a un tratamiento. De todos los modos, en ningún grupo de edad hubo una concordancia superior al 50%, lo que puede indicar la enorme dificultad en hacer un diagnóstico de pertussis (tabla 4.38).

Tabla 4.38. Eficiencia del diagnóstico clínico por grupos de edades.

Edad	Diag. clínico presunción.	Confirmación laboratorio.	% Concordancia. (I.C.95%)
0-6 meses	46	9	19,6% (13,4-25,8).
6-12 meses	3	1	33,3%
1-2 años	3	0	0%
2-3 años	4	1	25%
3-5 años	27	7	25,9% (19-32,8)
5-10 años	48	23	47,9% (40,1-55,7)
10-15 años	20	10	50% (42,2%-57,8%)
> 15 años	11	0	0%

#### 4.7.2.- Distribución estacional de las peticiones de estudio de pertussis

Enero, febrero y marzo fueron los meses en donde más se solicitaron el estudio de tosferina. En estos meses se hicieron el 54,9% de los análisis. En este mismo período de tiempo se obtuvieron el 47% de los resultados positivos. De esto parece desprenderse que cerca del 50% de los casos de tosferina se van a producir

durante los meses del invierno. Sobre el total de estudios de tosferina solicitados en esta estación del año, 89 pacientes, en 24 de ellos (26,9%) la respuesta fue afirmativa, es decir, el porcentaje global de aciertos del diagnóstico clínico con respecto al laboratorio fue del 26,9%. En el 73,2% restante no se pudo confirmar la sospecha clínica de pertussis. Posiblemente, en los meses de invierno puede existir mayor dificultad para realizar un diagnóstico clínico diferencial con los procesos infecciosos que afectan a las vías respiratorias.

La primavera fue la segunda estación del año en lo referente a la demanda de estudios de pertussis, con un 19,7% del total. Curiosamente, no se obtuvo ningún diagnóstico serológico positivo de pertussis en los meses de Mayo y Junio, aunque sí los hubo en el mes de Abril (13,7% de los diagnósticos positivos). Sería interesante estudiar las posibles implicaciones que pudieran tener los procesos alérgicos sobre la demanda de estudios.

En otoño se solicitaron el 17,9% de todos los estudios hallándose 15 casos positivos de los 29 solicitados, lo que representa cerca del 52% de concordancia con la sospecha clínica de tosferina. Quizás en esta época del año existen menos efectos confundentes con respecto a las patología respiratorias.

Por último , están los meses de verano con una demanda de estudios de un 7,4% . No se encontró ningún diagnóstico serológico de pertussis en los meses de Julio y Agosto. Los cinco casos con serología positiva se detectaron en el mes de Septiembre. Por tanto, desde el punto de vista del diagnóstico serológico de

---

pertussis, las infecciones por *B. pertussis* parecen incidir, fundamentalmente, entre los meses de Septiembre a Abril

Como resumen, el mayor número de peticiones se realizaron en invierno, seguido de la primavera, otoño. Los mayores porcentajes de positividades se obtuvieron en el invierno (47%), el otoño (29,4%) y el mes de Abril con un 13,7%. En el resto de los meses de la primavera y del verano no se detectaron ningún caso con diagnóstico serológico de tosferina (tabla 4.39).

Tabla 4.39. Distribución anual de las peticiones.

Mes	Peticiones (%) <sup>*</sup>	Serología positiva (%) <sup>†</sup>	% de Aciertos
Enero	22 (13,6)	9 (17,6%)	40,9
Febrero	41 (25,4)	8 (15,7%)	19,5
Marzo	26 (16,1)	7 (13,7%)	26,9
Abril	14 (8,6)	7 (13,7%)	50
Mayo	13 (8)	0 (0%)	0
Junio	5 (3,1)	0 (0%)	0
Julio	4 (2,5)	0 (0%)	0
Agosto	1 (0,6)	0 (0%)	0
Septiembre	7 (4,3)	5 (9,8%)	71,4
Octubre	7 (4,3)	5 (9,8%)	71,4
Noviembre	8 (4,9)	3 (5,9%)	37,5
Diciembre	14 (8,6)	7 (13,7%)	50
Total	162 (100)	51 (100%)	31,5

\* (%) Porcentaje sobre el total de peticiones

† (%) Porcentaje sobre el total de serología positiva.

En la tabla 4.40 se muestra el rendimiento de las peticiones de investigación serológica de pertussis por estación del año.

Tabla 4.40. Eficiencia del diagnóstico clínico por estaciones.

Estación	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
OR*	0,58 (0,28-1,2)	0,55 (0,20-2,5)	1,23 (0,34-4,3)	2,89 (1,18-7,1)
RR†	0,69 (0,44-1,1)	0,65 (0,32-1,3)	1,15 (0,55-2,4)	1,91 (1,22-3,0)
CHI <sup>2‡</sup>	2,54 (P=0,111)	1,70 (P=0,193)	0,13 (P=0,722)	6,67 (P=0,009)
C <sup>§</sup>	26,9%	21,8%	41,7%	51,7%

\* Odds Ratio (límite de confianza Cornfield 98%).

† Riesgo Relativo (límite de confianza Taylos 95%).

‡ Chi<sup>2</sup> Corrección Mantel Haenzel (Probabilidad).

§ Concordancia (%).

Los mejores rendimientos diagnósticos se obtuvieron durante los meses de verano y otoño. Esto parece indicar que en estos períodos del año existen menos procesos de vías respiratorias que induzcan al clínico a confusión diagnóstica. En los meses de inviernos, aunque el porcentaje de positividades serológicas es el mayor del año, con un 47 % de todos los casos con diagnóstico serológico de pertussis, también son los meses donde el clínico presenta las mayores dificultades para emitir un juicio diagnóstico certero. Únicamente, el 26,9% de los estudios demandados tuvieron una respuesta afirmativa.



#### 4.7.3.- Características de los síntomas clínicos en la cohorte de estudio

##### 4.7.3.1.- Tos

El tiempo medio transcurrido entre el comienzo de la tos y la demanda de estudio fue de 85,7 (D.S=48,9) días en los casos positivos y de 109 (D.S=57) días en los sujetos con anticuerpos negativos.

En los sujetos con serología positiva, la mediana de la demora en la petición estuvo en los dos meses, oscilando entre 4 días y un año. Las peticiones realizadas con una evolución de la tos inferior a un mes representaron el 43,1% (22 sujetos). De estos 22 sujetos, catorce peticiones correspondieron a niños con edades comprendidas entre los cuatro y los catorce años; ocho estudios pertenecieron al grupo de 10 lactantes con evidencia serológica de pertussis.

En el 56,9% restante, el tiempo transcurrido desde el comienzo de la tos hasta la demanda del estudio de *B. pertussis* fue superior a un mes. La mayoría de los niños, 25, llevaban entre los dos y seis meses de evolución de la tos (figura 4.7.3). Una posible explicación de esta demora podría ser la sintomatología atípica producida por *B. pertussis* en los sujetos vacunados. En el 56,8% de las serologías negativas, el tiempo de evolución de la tos, previo al análisis, fue inferior a un mes; en 9 (8,1%) de los 111 sujetos fue superior a un año.

El predominio nocturno de la tos se observó en el 37,2% y 49,1% de las serologías positivas y negativas, respectivamente. No se detectó ninguna asociación entre el resultado serológico y el predominio nocturno de la tos [ $\chi^2 = 0,68$ ;  $P = 0,41$  (Mantel-Haenszel); Odds ratio = 0,75 (Cornfield al 95%: 0,36-1,56)].

La sensación de picor de garganta fue respondida afirmativamente en el 50% de los sujetos seropositivos con capacidad para contestar a esta pregunta, y en el 72,4% de los seronegativos [ $\chi^2 = 0,44$ ;  $P = 0,51$  (Mantel-Haenszel); Odds ratio = 1,38 (Cornfield al 95%: 0,48-3,99)(tabla 4.39)

#### 4.7.3.2.- Vómitos

No fue posible demostrar asociación entre los vómitos y la serología de pertussis. Los vómitos estuvieron presentes en el 37,2% de las serologías positivas frente al 43,2% de los sujetos con serología negativa [ $\chi^2 = 0,05$ ;  $P = 0,82$  (corrección de Mantel-Haenszel); Odds ratio = 1,08 (Cornfield al 95% : 0,52-2,22).(tabla 4.41)

#### 4.7.3.3.- Petequias

Se pudo observar una tendencia a la asociación entre la evidencia serológica de pertussis y la presencia de petequias. Los estadísticos encontrados fueron:

Odds ratio 2,43 (0,81-7,26).

Riesgo relativo 1,71 (Taylor al 95% : 1,01 - 2,91).

Chi2 = 3,2; P = 0,074 (Mantel-Haenszel).

Estas estuvieron presente en el 21,4% de los sujetos, predominantemente lactantes, localizándose en cara y tronco (tabla 4.41).

#### 4.7.3.4.- Estudio hematológico/bioquímico

Los recuentos leucocitarios no fueron estadísticamente diferentes entre los sujetos con serología positiva o negativa. Por el contrario, el recuento linfocitario fue más importante en los sujetos con serología positiva, siendo estadísticamente diferente a los sujetos con serología negativa. Con respecto a los eosinófilos, se observó justamente lo contrario. Esta población leucocitaria fue más importante en los sujetos con serología negativa (tabla 4.41):

Serología +: 10,310 (D.S. 1910) linfocitos/mm<sup>3</sup>.

Serología -: 8,006 (D.S. 2158) linfocitos/mm<sup>3</sup>.

t = 3,12; P = 0,003; p < 0,001.

Serología +: 138 (D.S. 94) eosinófilos/mm<sup>3</sup>.

Serología -: 434 (D.S. 151) eosinófilos/mm<sup>3</sup>.

t = 5,30; P = 0,000; p < 0,001.

No se observaron hipoglucemias en ninguno de los especímenes remitidos para el estudio de tosferina. La glucemia media en los sujetos con serología positiva fue de 94,5 (D.S. 28) mg/dL y de 104 (D.S. 33,7) mg/Dl. en los sujetos seronegativos. No se pudo objetivar ninguna diferencia estadísticamente significativa (tabla 4.41).

Tabla 4.41. Características clínicas de la cohorte con diagnóstico clínico de pertussis.

	Seropositivos	Seronegativos
Mujeres	47%	46,8%
Varones	53%	53,2%
Días/petición	85,7 (D.S. 48,9)	109 (D.S. 57)
Tos nocturna	37,2%	44,1%
Picor garganta	50%	72,4%
Vómitos	45,1%	43,2%
Petequias	17,6%	8,1%
Leucocitos/mm <sup>3</sup>	16422 (Er.St. 264)	15242 (Er.St. 470)
Linfocitos/mm <sub>3</sub>	10310 (Er.St. 270)*	8006 (Er.St. 205)*
Eosinófilos/mm <sup>3</sup>	138 (Er.St. 13)*	434 (Er.St. 14)*
Glucemia mg/dL	94,5 (Er.St. 4)	104 (Er.St. 3.5)

\*  $p < 0.001$ .

#### 4.7.3.5.- Estudio bacteriológico

Cuatro cultivos fueron positivos en los 162 sujetos remitidos para estudio, lo que representa un porcentaje de aislamiento del 2,5%. Sobre los 51 sujetos seropositivos, estos cuatro aislamientos representan el 7,7%, siendo todas las

especies aisladas identificadas como *B. pertussis*. Los cuatro cultivos positivos pertenecieron a: un lactante de tres meses, otro de cuatro meses, una niña de siete años y otra niña de diez años. En el lactante de cuatro meses (con una dosis de vacuna), *B. pertussis* tardó en crecer once días.

Estos niños tenían en común el escaso tiempo transcurrido entre el comienzo de la tos y la solicitud de estudio, de 4 a 10 días, y el no estar sometidos a tratamiento antibiótico.

En los ocho lactantes restantes, con evidencia serológica de tosferina, edades comprendidas entre el mes y los siete meses y con un tiempo de evolución de la tos que osciló entre los 3 y 25 días, no se logró aislar *B. pertussis*. Seis de ellos estaban tomando antibióticos cuando se solicitó el estudio desde, por lo menos, 48 horas antes de la toma del cultivo nasofaríngeo. A cuatro de ellos les dieron eritromicina, otro ampicilina y el sexto estuvo tomando ampicilina y eritromicina antes de la extracción del espécimen nasofaríngeo para cultivo. En los dos restantes lactantes no se pudo confirmar este punto y en uno de ellos, de siete meses de edad cuando se demandó el estudio, la enfermedad lleva una evolución de dos meses.

Treinta y nueve (95%) de los sujetos vacunados con criterio serológico de tosferina estaban tomando antibióticos cuando acudieron a la consulta.

Los antibióticos administrados fueron los siguientes:

- Amoxicilina en 20 sujetos (51%).
- Eritromicina en 8 sujetos (20,5%).
- Dos o más antibióticos en 5 sujetos (12,8%).
- SXT en 4 sujetos (10,3%).
- Otros antibióticos en 2 sujetos (5,1%).

La detección de *B. pertussis* en los portas preparados con especímenes nasofaríngeos por inmunofluorescencia directa fue negativa en todos los casos estudiados. En uno de los casos con cultivo positivo, el resultado fue dudoso debido a la enorme dificultad en la identificación de la bacteria entre los múltiples residuos existentes (células epiteliales, filamentos mucosos, etc) en las preparaciones y a la adsorción inespecífica de la fluorescencia en algunos de estos residuos.

#### 4.7.3.6.- Estudios de anticuerpos en sujetos con evidencia serológica de tosferina

En los lactantes, el tiempo medio transcurrido entre el comienzo de los síntomas y la aparición del primer anticuerpo anti-*B. pertussis* fue de 21 días. En tres de los diez lactantes seropositivos o con cultivo positivo hubo necesidad de un segundo espécimen para la demostración de la respuesta humoral. En estos lactantes, los especímenes de fase aguda se pidieron a los 3, 7 y 21 días del comienzo de la tos. En el 70% restante, el diagnóstico serológico se realizó en la primera muestra remitida.

Los anticuerpos producidos por los lactantes pertenecían a los tres isotipos. Una respuesta humoral del isotipo IgG se vio en el 90%; la IgM se detectó en el 80% y la IgA en el 40% de los lactantes.

Dos lactantes, de 3 y 4 meses de edad, seropositivos para IgG (1/320-1/640) e IgM (1/80) y en los que se obtuvieron varios especímenes hasta los seis y ocho meses de edad, respectivamente, no se observó ninguna respuesta humoral a las distintas dosis de vacunas.

En lo referente a los niños vacunados seropositivos, en ninguno de ellos se necesitó dos especímenes para establecer un serodiagnóstico de pertussis. Se observó una respuesta de IgG en el 70,7% de los niños, IgM en el 48,8% e IgA en 26,8%. En una niña de siete años, con una evolución de la enfermedad de 4 días, cultivo positivo e inmediato comienzo del tratamiento con eritromicina no hubo respuesta de anticuerpos contra *B. pertussis*.

No se detectaron anticuerpos sugerentes de pertussis hasta pasados 21 días del comienzo de la tos. Pasados estos días, aunque se pueden encontrar anticuerpos de los isotipos IgG e IgA, los anticuerpos del isotipo IgM son los que se observan a títulos más altos (tabla 4.42) y en mayor porcentaje (67%) (tabla 4.43).

Los anticuerpos IgM se empiezan a detectar a partir de la tercera semana del comienzo de la tos, alcanzan sus títulos más altos entre el mes y los tres meses, no detectándose más allá de los siete meses. Su período de utilidad diagnóstica se

extiende desde las tres semanas hasta los seis meses. Después, únicamente se detectarán en el 10% de los especímenes (tablas 4.42, 4.43).

El isotipo IgA comienza a detectarse al mes de evolución de la tos, alcanza su pico entre el mes y los cinco meses, y se negativiza a los ocho meses. Su utilidad diagnóstica va desde el primer mes hasta los cinco meses del comienzo de la tos, negativizándose después en el 80% de los sujetos. Es el isotipo que presenta la respuesta más débil al estímulo antigénico de *B. pertussis* (tablas 4.42, 4.43).

Los anticuerpos IgG pueden estar presentes junto con los anticuerpos del isotipo IgM, alcanzan su cenit entre el primero y octavo mes, descendiendo lentamente. A los 24 meses del comienzo de la infección por *B. pertussis*, estos anticuerpos se encuentran todavía en el 57% de los sujetos a unos títulos que pueden llegar hasta la dilución 1/320. Son los anticuerpos que se producen con mayor intensidad, llegando a alcanzar títulos tan importantes como 1/2560 (tabla 4.42, 4.43).



Tabla 4.42. Evolución del recíproco de la dilución en los anticuerpos anti-*B. pertussis* en sujetos con diagnóstico serológico de pertussis.

Tiempo (meses)	Título IgG			Título IgA			Título IgM		
	min.	Mediana.	Max	min.	Mediana.	Max	min.	Mediana.	Max
0 - 0.5	0	10	10	0	0	0	0	0	0
0.5 - 1	0	10	320	0	0	20	0	80	640
1 - 2	10	320	1280	0	0	640	0	80	640
2 - 3	80	320	1280	0	20	640	0	160	1280
3 - 4	80	640	2560	0	40	640	0	40	640
4 - 5	160	640	2560	0	40	320	0	40	160
5 - 6	160	320	1280	0	0	10	0	10	80
6 - 7	80	320	1280	0	0	20	0	0	40
7 - 8	80	320	1280	0	0	20	0	0	0
8 - 9	80	320	640	0	0	0	0	0	0
12	80	320	640	0	0	0	0	0	0
18	40	160	640	0	0	0	0	0	0
24	0	80	320	0	0	0	0	0	0

Tabla 4.43. Evolución de la prevalencia de anticuerpos en sujetos seropositivos.

Tiempo (meses)	Nº espe- címenes	IgG > 1/160		IgA > 1/10		IgM > 1/40	
		nº casos	%	nº casos	%	nº casos	%
0 - 0.5	4	0	0	0	0	0	0
0.5 - 1	18	2	11	2	11	12	67
1 - 2	39	21	54	15	38	25	64
2 - 3	16	12	75	8	50	10	62
3 - 4	19	13	68	8	42	6	32
4 - 5	20	12	60	8	40	7	35
5 - 6	11	7	64	2	18	3	27
6 - 7	21	13	62	2	10	2	10
7 - 8	10	6	60	2	20	0	0
8 - 9	17	11	65	0	0	0	0
9-12	17	11	65	0	0	0	0
12-18	13	7	54	0	0	0	0
18-24	7	4	57	0	0	0	0

#### 4.7.3.7.- Detección de anticuerpos en saliva

Se detectaron anticuerpos en 40 (24,7%) salivas de los 162 sujetos remitidos para estudio. De éstos, 23 resultados positivos pertenecieron a los sujetos con criterio serológico de pertussis, lo que representa el 45% de los seropositivos; las 17 salivas positivas restantes pertenecían a sujetos seronegativos, lo que equivale al 15,3% de éstos.

Los isotipos encontrados fueron IgG e IgA y con unos títulos que no sobrepasaron la dilución 1/16. En los sujetos seronegativos, las diluciones observadas oscilaron entre un medio y un octavo. En ningún caso se pudo evidenciar una correlación entre los anticuerpos en saliva y las concentraciones e isotipos séricos. Por tanto, los títulos de anticuerpos encontrados en la saliva no parecen aportar ninguna ayuda diagnóstica. Lo que sí pudiera presentar cierto interés, es la frecuencia de los hallazgos positivos en los sujetos seropositivos o la ausencia de anticuerpos en la saliva de los sujetos seronegativos:

- Odds ratio = 4,54 (Cornfield 95%: 2-10,39).
- Riesgo relativo = 2,51 (Taylor al 95% de 1,65-3,81);
- Chi2 (corrección de Mantel-Haenszel) de 16,57; P=0,000047.

La utilidad diagnóstica de la detección de anticuerpos en saliva parece residir en su valor predictivo negativo. El 77% de los resultados negativos en saliva pertenecerán a sujetos sin evidencia serológica de tosferina. La calidad diagnóstica de los anticuerpos en saliva es la siguiente:

- Sensibilidad: 0,45.
- Especificidad: 0,85.
- Valor predictivo positivo: 0,57.
- Valor predictivo negativo: 0,77.
- Eficacia diagnóstica: 0,72.

El isotipo IgA se pudo detectar en la saliva entre el mes y los tres meses de evolución de la tos. El isotipo IgG se observó desde el mes hasta los cinco meses de la evolución de la sintomatología. No se observó ningún anticuerpo del isotipo IgM.

## **5.- DISCUSSION.**

Con la aparición y utilización de la vacuna contra la tosferina, a finales de la década de los cuarenta, se introdujeron profundos cambios en la presentación clínica y epidemiología de esta enfermedad. Estos cambios epidemiológicos fueron muy variables, incluso dentro de un mismo país, dependiendo de múltiples factores. Algunos factores son conocidos como la edad de comienzo del calendario de inmunizaciones, las pautas y número de dosis de vacuna administradas para considerar finalizada la inmunización contra la tosferina, la aceptación social de la vacuna, la composición de la misma (vacuna celular, adsorbida o no; acelular: uno, dos o múltiples componentes), eficacia de los distintos lotes de vacunas, tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna, etc. Otros cambios epidemiológicos más complejos son parcialmente explicados por la utilización de las vacunas, tales como: los mecanismos de perpetuación y transmisión de la enfermedad (reservorios, transmisores,); la aparición de brotes epidémicos con modelos estacionales distintos y afectación poblacional, incluso dentro de una misma nación; edad y sexo de los sujetos afectados; frecuencia de aparición de los ciclos epidémicos; etc. (3,15,27,36,38,39,51,52,62,64,66,68-70,72,74-77,83,158,220, 222,259-263). Bien es cierto, que parte de la complejidad de esta enfermedad está originada por la dificultad para efectuar un diagnóstico clínico certero, por los diferentes criterios utilizados para la aceptación del diagnóstico de pertussis e inclusión en los boletines epidemiológicos nacionales. En algunos países, como Suecia e Italia, se acepta la información recogida de los padres para la inclusión de la enfermedad en los registros epidemiológicos (51,62,70,264). En otros países es suficiente el diagnóstico clínico para la inclusión de la enfermedad en los boletines epidemiológicos. Diagnósticos clínicos basados, unas veces en el criterio personal del médico

(70,74,265); aunque en la mayoría de las veces, el diagnóstico clínico está basado en la duración de la tos, variando los requerimientos de esta duración según los autores u Organismos de Salud Nacionales o Internacionales entre los 7 días (36,38), 14 días (39,51,63), 21 días (36,64,65), o más de tres semanas (62,66,266).

En los últimos años están emergiendo esfuerzos tendentes a la unificación de los criterios diagnósticos para la definición del caso clínico de pertussis por parte del CDC (61) y de la OMS (Miller E, Farrington EC, World Health Organization meeting on pertussis case definitions, Geneva, Switzerland, January 10-11, 1991. Citado en la referencia 65), y a la clasificación de los casos clínicos en subclases: definitivo, probable, posible, primario, co-primario, índice y secundario (61,36,64,265). Esta tendencia a la aproximación de criterios para el diagnóstico de pertussis es un exponente del enorme problema existente para hacer un diagnóstico correcto de tosferina basado, únicamente, en criterios clínicos. Problemas diagnósticos existentes incluso desde antes del comienzo de las campañas de vacunaciones, cuando el cuadro clínico desencadenado por "*Haemophilus pertussis*" no estaba modificado por los cambios epidemiológicos introducidos por las inmunizaciones, o por el tratamiento con antibióticos (35). Problemas de diagnóstico clínico incluso después de intensas campañas sobre pertussis emitidas por la televisión para su difusión y conocimiento (37), existiendo múltiples referencias en la literatura que ahondan en este punto (13,38,39). Esta dificultad no afecta, únicamente, a los individuos vacunados, pudiéndose ver incrementada en los recién nacidos y lactantes no vacunados en donde pueden faltar los síntomas clásicos de la pertussis, como la tos y el estridor laríngeo (11-13,30,31,40,47).

### 5.1.- Seroprevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en recién nacidos y neonatos

La prevalencia y título de anticuerpos anti-*B. pertussis*, cedidos por la madre a su recién nacido es una de las modificaciones epidemiológicas de la pertussis ocasionada con la introducción de la vacuna y sus pautas de administración (10).

La situación humoral de recién nacido será una expresión de la situación humoral de la madre con respecto a *B. pertussis*. Las madres con títulos altos de anticuerpos del isotipo IgG cederán cantidades importantes de éstos a sus hijos. Las madres con una inmunidad contra *B. pertussis* debilitada no podrán ofrecer esta protección a sus hijos.

En el Area Sanitaria 10 se detectó un 83,9% de las 112 sangres de cordón de la cohorte de referencia con anticuerpos contra *B. pertussis* a unos títulos iguales o ligeramente superiores a los encontrados en los especímenes de sus madres. Esta cifra ya está aportando información sobre el alto porcentaje de madres con anticuerpos dirigidos contra *B. pertussis*, lo cual solamente puede ser la consecuencia de infección o infecciones recurrentes en estos adultos. Esta cifra contrasta claramente con la prevalencia del 33% referida por algunos autores en los recién nacidos de Estados Unidos (11,14,47,66,267). Esta diferente seroprevalencia en los recién nacidos únicamente puede ser debida (aparte de la variabilidad metodológica empleada en la obtención de estos datos) (15,27,39,76) a una distinta prevalencia de anticuerpos en ambas poblaciones de mujeres en edad de procrear,



como consecuencia de una situación epidemiológica distinta (pautas de vacunación, hábitos socio-sanitarios, etc.) (268).

#### 5.1.1.- Poder protector de los anticuerpos cedidos por la madre al hijo

La siguiente pregunta que se planteó, fue sobre la duración de la protección que estos anticuerpos maternos proporcionaban a sus hijos. Con respecto a este punto, existen opiniones opuestas. Bass niega la transferencia y, por tanto, la protección de los anticuerpos maternos al recién nacido basándose en criterios epidemiológicos comparativos con enfermedades víricas como el sarampión, la rubéola, paperas y varicela (270). Sus argumentos se basaban en el aumento de incidencia de tosferina que se ha producido en menores de un año después de la introducción de la vacuna, no observándose este incremento de incidencia en las enfermedades víricas. Entre 1907 y 1922, solamente el 9,3% de los casos de tosferina se producían en menores de un año. Entre 1979 y 1987, el porcentaje de casos de tosferina en menores de un año de edad aumentó hasta el 46,5%, no incrementándose las enfermedades víricas (270,271). George y Path (272) esgrimen razonamientos similares en un estudio retrospectivo efectuado en Inglaterra entre 1977 y 1989. El 6% de los 251 casos de tosferina, bacteriológicamente probados, se produjeron en el primer mes de vida; el 19,9% en el primer trimestre y el 21,1% en los lactantes entre los tres y los seis meses de vida.

En contra de la opinión de estos autores se podría decir, en primer lugar, que los mecanismos inmunitarios desencadenados en las infecciones bacterianas son

distintos a los desencadenados en las infecciones víricas, tanto en la bases celulares que los soportan, como en la duración de la inmunidad (273). Por otro lado, con estos datos lo que se puede inferir es que se ha producido un cambio epidemiológico en el pico de incidencia de la enfermedad. Antes de la introducción de la vacuna contra *B. pertussis*, el máximo pico de incidencia de la enfermedad se producía entre el año y los seis o nueve años (10,15,48,66,76, 270). Esto, indirectamente, estaba indicando que los lactantes nacidos en la era pre-vacunal estaban protegidos contra la enfermedad porque sus madres les debían transmitir una importante concentración de anticuerpos generados por infecciones naturales con *B. pertussis*. Y como es sabido, las infecciones naturales aportan una inmunidad más duradera e intensa que la que se obtiene después de la vacunación (10,70,76). Por tanto, no se puede negar la transmisión de anticuerpos a través de la placenta.

Otro tema distinto es la duración de la capacidad protectora de dichos anticuerpos. Tanto Bass (270,271) como George y Path (272) no estudiaron la vida media de los anticuerpos cedidos por la madre a su hijo. Como se puede deducir de los resultados expuestos en el apartado 4.2.4, los anticuerpos maternos cedidos van a experimentar un catabolismo acelerado. A los quince días de vida, los títulos de IgG van a estar reducidos a menos de la cuarta parte de los que había en el momento del nacimiento. El lactante de un mes de edad tendrá unos niveles de anticuerpos anti-*B. pertussis* que estarán comprendidos entre el 10% y el 12,6% del título que presentó al nacer. Martin, en un estudio realizado en Suiza a finales de los 50, refiere resultados semejantes (274). Savage y col., asumiendo una ecuación de regresión lineal, calcularon la vida media de los anticuerpos cedidos por la madre a su recién

nacido en unas seis semanas (279). Si en este estudio también se hubiera elegido una ecuación de regresión lineal, la vida media de los anticuerpos cedidos por la madre se estimaría en 38,2 días con unos valores extremos entre los 14,3 días y los 66,1 días. Por tanto, en el estudio de la transmisión o no de anticuerpos anti-*B. pertussis* de la madre al hijo y la protección que estos anticuerpos suministran al recién nacido habrá que tener presente el título de anticuerpos en las madres de esos recién nacidos y la vida media que estos anticuerpos tienen en el neonato. Sin estos datos, todas las discusiones que se hagan conducirán a unas conclusiones erróneas.

La estimación de la protección de los anticuerpos maternos habrá que basarla en criterios clínicos o serodiagnósticos de pertussis. Todavía no se han podido establecer unos títulos y especificidades antigénicas de anticuerpos que posean capacidad protectora contra la infección por *B. pertussis* (218,284,285). Los escasos estudios por aglutinación realizados después de la implantación de la vacuna confieren un papel protector a los títulos superiores al 1/160 o 1/320 (266,286), aunque no hay evidencia de que la aglutinación mida directamente el factor o los factores responsables de la producción de la inmunidad. La producción de aglutininas es una de las propiedades de la vacuna, que puede no estar relacionada con la capacidad protectora conferida por las inmunizaciones (287). Los ensayos serológicos miden la respuesta de anticuerpos a la vacuna, permitiendo la comparación entre grupos en respuesta a distintas pautas o tipos de vacunas (288). Resumiendo, es difícil valorar qué especificidades y qué concentraciones de

anticuerpos proporcionan inmunidad contra la infección y protección contra la enfermedad sintomática.

En ninguno de los neonatos remitidos con sospecha clínica de tosferina, o estudiados en la cohorte de referencia, se pudo realizar un diagnóstico de pertussis por el laboratorio, bacteriológicamente o mediante serología. Los primeros casos de tosferina se empezaron a detectar a partir del mes de edad.

Farizo y col. (66), en Estados Unidos, reportan el 77% de los casos de pertussis en menores de un año. La mayor tasa de incidencia, dentro de los lactantes menores de seis meses, se encontró en los lactantes con una edad comprendida entre el mes y los dos meses. Por tanto, parece ser que los neonatos están protegidos por los anticuerpos transferidos por sus madres. Esta corta protección aportada por los anticuerpos maternos ha inducido a proponer a muchos autores la necesidad de vacunar contra la tosferina en el tercer trimestre del embarazo para alargar la protección de los anticuerpos maternos (30,66,274,275). Cohen y Scandron, en 1943, no encontraron ningún caso de pertussis en lactantes nacidos de madres inmunizadas entre 6 semanas y 2 meses antes del parto, pero sí en los neonatos nacidos de mujeres no inmunizadas durante el embarazo. Si las madres poseían unos títulos altos de anticuerpos anti-*B. pertussis*, sus hijos iban a estar protegidos contra la pertussis durante los seis primeros meses de vida (276). El concepto de la protección pasiva del feto por anticuerpos transferidos por la madre se remonta a 1879. En este año Jenner describe la inmunidad conferida por las mujeres vacunadas con el virus de la vacuna a sus recién nacidos durante los

primeros días de vida . Esta es una alternativa que se ha utilizado y se utiliza en países en vías de desarrollo para la protección de los lactantes contra las infecciones bacterianas, tales como pertussis, difteria, tétanos, meningitis, etc. Las embarazadas son vacunadas entre las 34 y las 36 semanas de gestación (275).

En países con baja tasa de cobertura de vacunaciones (Italia, Suecia) el riesgo de adquirir una pertussis clínicamente reconocible es menor en el primer año de vida. Esto podría ser debido a la presencia de anticuerpos maternos protectores en los lactantes o a la dificultad del diagnóstico clínico en esta edad (48,70).

Así pues, la opinión más generalizada es la que admite la transferencia de protección contra la tosferina, aunque, eso sí, con unas prevalencias y duración variables dependiendo de la situación seroepidemiológica de la zona. Los anticuerpos cedidos transplacentariamente, naturalmente son del isotipo IgG, siendo los títulos en el neonato iguales o ligeramente superiores a los títulos presentes en la sangre materna (63,64,140,215,274,277-283).

Como resumen de este apartado se puede decir:

- Existe una transferencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* de la madre al feto.
- Los recién nacidos presentan unas concentraciones de anticuerpos ligeramente superiores a las que tienen sus madres.
- La prevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en la cohorte de referencia es de un 83% en las madres y un 84% en los recién nacidos.

- En el 16% de los neonatos del estudio no se detectaron anticuerpos, lo que podría indicar una ausencia de protección contra la pertussis.
- La vida media de estos anticuerpos es muy corta, ajustándose a una función de tipo recíproco. Al mes de vida, los niveles de anticuerpos estarán al 11% de los niveles en el nacimiento.
- Ninguno de los neonatos de este estudio tuvo evidencia serológica o bacteriológica de pertussis.
- El diagnóstico de pertussis más precoz se hizo en lactantes de un mes de vida.

## 5.2.- Edad de comienzo del calendario de inmunizaciones contra la tosferina

Determinar la fecha para el comienzo del calendario de inmunizaciones contra la tosferina puede ser muy difícil, y de hecho no hay unas pautas aceptadas universalmente.

Con los datos obtenidos en este estudio en lo referente al comportamiento de los anticuerpos maternos, se puede plantear la posibilidad de comenzar las inmunizaciones a partir del mes de vida, al menos en el 75,5% de los lactantes. No parece oportuno comenzar las vacunaciones antes de este tiempo. Las inmunizaciones a edades más precoces pueden ocasionar una respuesta pobre (incluso ausente) de anticuerpos en los neonatos y, sobre todo, en neonatos con títulos altos de anticuerpos maternos. Estos anticuerpos podrían unirse a los antígenos suministrados por la vacuna, neutralizarlos e impedir el reconocimiento de

los mismos por el sistema inmunológico del lactante. (275,278-280). Además, las inmunizaciones en los neonatos pueden ocasionar una parálisis inmunológica por la inmadurez de su sistema inmunológico (267).

Las inmunizaciones comenzadas a partir del mes de vida producen respuestas de anticuerpos aceptables (266), aunque se obtienen mejores respuestas en lactantes mayores, con un sistema inmunológico más desarrollado (266,274,278,288-291). Por otro lado, aunque las reacciones adversas de la vacunación son menos severas en los lactantes mayores (3), no hay contraindicación formal para empezar a vacunar a partir del mes de vida (47,66,73,274,286,288)). Por tanto, habrá que llegar a un equilibrio entre la incidencia de tosferina, niveles de anticuerpos en la población diana, severidad de la enfermedad (sin olvidar que la mayor morbilidad y mortalidad se produce en los menores de seis meses), para establecer la edad de comienzo del calendario de vacunas, así como los intervalos entre cada dosis (66,278,291).

No obstante, la potencial susceptibilidad de los neonatos a contagiarse con *B. pertussis*, ha creado en algunos neonatólogos la inquietud de inmunizar a los recién nacidos contra la tosferina antes de que abandonen la unidad de neonatología (292).

### 5.2.1.- Pautas de inmunizaciones

Las recomendaciones para el comienzo del calendario vacunal varían de unos países a otros. Básicamente, se pueden agrupar en tres grandes esquemas:

A) Inmunizaciones en Estados Unidos y Canada. Consisten en cinco dosis de vacunas con bacterias. El comienzo se realiza a los dos meses de vida, administrándose tres dosis con un intervalo comprendido entre 4 y 8 semanas. Con estas tres primeras dosis se considera finalizada la inmunización primaria, recomendándose dos dosis más de recuerdo (3). La cuarta dosis se administrará a los doce meses de la tercera dosis, y la quinta dosis en la edad preescolar (79).

B) Inmunizaciones en Europa. La vacuna está constituida por bacterias. El comienzo se suele realizar entre los dos y los tres meses de vida (62,293), aunque en algunos países como Dinamarca no se comienza el calendario de inmunizaciones hasta los cinco meses de edad (294). El calendario de vacunaciones o la inmunización primaria se considera completado cuando se han administrado dos dosis más con un intervalo de uno o dos meses, es decir, después de recibir tres dosis de vacuna. Un número de dosis de vacuna inferior a tres no produce protección (3,295). En España se considera completado el calendario cuando se inyecta la tercera dosis de vacuna a los siete meses de edad (87). En algunos países, se añade una cuarta dosis de recuerdo a los doce meses de la tercera inyección (294).



C) Inmunizaciones con vacunas acelulares. Aunque existen seis fabricantes en Japón (265,295), prácticamente sólo se utilizan dos tipos. La constituida fundamentalmente por Hemaglutinina filamentosa y escasa cantidad de Factor Promotor de la Linfocitosis ( Takeda: 2  $\mu\text{g/ml}$  de LPF, 8  $\mu\text{g/ml}$  de FHA, 33 fl/ml de toxoide diftérico, 5 fl/ml de toxoide tetánico y 200  $\mu\text{g/ml}$  de alumina) (281), o el tipo Biken con toxina pertussis únicamente (78  $\mu\text{g/dosis}$ ) o combinada con hemaglutinina filamentosas (PT 47  $\mu\text{g/dosis}$  y FHA 93  $\mu\text{g/dosis}$ )( 284). Los otros cuatro tipos restantes tienen cantidades intermedias de estos dos factores, más aglutinógenos o/y otros antígenos como las proteínas exteriores de membrana (265). Estos tipos de vacunas acelulares se están utilizando oficialmente en Japón desde el otoño de 1981, encontrándose en evaluación en Suecia a consecuencia de haberse suprimido la vacunación con bacterias completas en 1979 (75).

Las pautas de inmunización con vacunas acelulares varían según los países en donde se utilicen. En Japón se comienza la inmunización a los 18-24 meses de edad, administrándose dos dosis con un intervalo de un mes. Una tercera dosis se suele administrar a los doce meses de la segunda dosis (281,295).

En Diciembre de 1991, la US Food and Drug Administration (FDA) autorizó la primera vacuna triple acelular (Acel-immune) para administrar a los niños como cuarta y quinta dosis de recuerdo (296). En Febrero del 92, otra vacuna triple acelular ha sido autorizada en Estados Unidos con la misma finalidad (Tripedia)(297-299).

Independientemente de las pautas de administración y del tipo de vacuna empleada (celular o acelular), la vacuna contra *B. pertussis* se suele administrar conjuntamente con los toxoides tetánico y diftérico.

#### 5.2.2.- Respuesta de anticuerpos a las distintas dosis de vacuna

La respuesta de anticuerpos a la vacuna se empieza a manifestar tímidamente al mes de la iniciación del calendario de vacunaciones. El isotipo de respuesta predominante es la IgG, escasa respuesta de anticuerpos IgM y, prácticamente, no se detecta IgA. En esta última inmunoglobulina no se empezará a observar un levisimo incremento hasta transcurrido dos meses de la primera dosis de vacuna. Estos períodos de latencia en la respuesta de los diferentes isotipos se seguirá manteniendo con las siguientes inmunizaciones, variando la intensidad de la respuesta de anticuerpos a las distintas dosis. Se necesitarán, al menos, dos dosis de vacuna para poder observar una clara respuesta de anticuerpos. No parece que las vacunas acelulares produzcan respuestas más rápidas e intensas. Glode y col. (300) y Tomoda y col.(301) , con vacuna acelular como dosis de recuerdo, detectan la respuesta de anticuerpos al mes de la inoculación. Los mismos períodos de latencia e intensidad de respuesta por número de dosis han sido descritos tanto con vacunas bacterianas, como con vacunas acelulares (209,274,302)

La función que mejor define la síntesis de anticuerpos en respuesta a las distintas dosis de vacuna es una ecuación de regresión lineal calculada entre los tres y los doce meses de edad, momento en que los anticuerpos comienzan a descender.

Los estímulos homogéneos y periódicos de las distintas dosis de vacuna provocan una respuesta sostenida hasta después de cinco meses de haber finalizado las vacunaciones. Baker y col.(263) con vacuna con bacterias completas refieren resultados superponibles a los encontrados en este trabajo. Comienza a detectar respuesta de anticuerpos del isotipo IgG a partir de la segunda dosis de vacuna, mostrando los títulos de anticuerpos una respuesta lineal con respecto al tiempo transcurrido de las inmunizaciones.

El principal anticuerpo producido en respuesta a las vacunas es del isotipo IgG, llegando a alcanzar títulos del 1/1280. La máxima respuesta de este anticuerpo se alcanzará a los diez meses de edad, es decir, tres meses después de la última dosis de vacuna, con un plateau comprendido entre los 9 y 13 meses de edad, o entre los 2 y 6 meses después de la última dosis.

Es conveniente resaltar la escasa o pobre respuesta que la vacuna provocó en el 26,7% de los lactantes, no llegándose a alcanzar títulos superiores al 1/40. Esto es un hecho constatado en la literatura, atribuyéndose a diversas causas. Una sería a la existencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en los lactantes cuando se comenzó el calendario de vacunaciones, al menos con las vacunas celulares (278,280). Savage y col.(279) observaron este fenómeno en lactantes inmunizados con vacuna celular y que tenían unos niveles altos de anticuerpos maternos anti-toxina pertussis; esta inhibición de la respuesta no se observó en los lactantes inmunizados con la vacuna acelular o cuando los anticuerpos previos a las inmunizaciones estaban dirigidos contra la hemaglutinina filamentosa. Baraff y col.(278) refieren una escasa respuesta

a la inmunización primaria en un 33% de lactantes que tenían unos títulos de aglutininas superiores al 1/40.

Otra posible explicación de la escasa respuesta de anticuerpos obtenida en este 26,7% de los niños pudiera ser el contenido antigénico de la vacuna (282) o a la existencia de lactantes buenos y malos respondedores a las vacunas (285).

### 5.2.3.- Tipo de anticuerpos producidos en respuesta a las vacunaciones

Existe acuerdo unánime en que la respuesta principal de anticuerpos al calendario de vacunaciones es fundamentalmente del isotipo IgG, independientemente del tipo de vacuna utilizada, celular o acelular (209,263,278,281,303-305).

La vacuna provocó una respuesta pobre de anticuerpos de los isotipos IgA e IgM en el 19,2% (12,8% a 22,4%) y 29,9% (26% a 33,8%) de los lactantes del grupo de referencia, respectivamente (intervalo de confianza del 95% y poder de contraste del 91,8%). Es cierto, que estas respuestas son poco importantes, y por supuesto, mucho menores que las encontradas después de la infección por *B. pertussis*, hecho que resultará de gran utilidad a la hora de efectuar un diagnóstico serológico de pertussis (50,129,174,177, 203,212,304,306-309). Utilizando enzimoimmunoensayos específicos, Thomas y col. (63) encontraron anticuerpos del isotipo IgA dirigidos contra los aglutinógenos y hemaglutinina filamentosa en el 80% de los sueros analizados después de recibir su tercera dosis de vacuna y, en menor proporción,

20%, contra la toxina pertussis. Baraff y col. (278) hallaron anticuerpos del isotipo IgM dirigidos contra la toxina pertussis y la hemaglutinina filamentosa en respuesta a la vacuna celular. Macaulay detecta una débil respuesta IgM que alcanzó su pico máximo a las seis semanas de la tercera dosis (309). De todo esto puede extraerse unas conclusiones básicas:

- Las vacunas, celulares o acelulares, inducen una respuesta de anticuerpos pertenecientes al isotipo IgG, fundamentalmente.
- El porcentaje de detección de los otros isotipos (IgA e IgM) dependerá de la sensibilidad o punto de corte elegido en el estudio serológico. No obstante, en lo que si existe un acuerdo casi unánime es en los bajos niveles detectados de estos isotipos, cuando se producen en respuesta a la vacuna. Este hecho será de gran utilidad a la hora de hacer serodiagnóstico en lactantes.

#### 5.2.4.- Duración de la respuesta de anticuerpos evocados por las vacunaciones

A los cinco meses de finalizada la inmunización primaria contra la pertussis, se produce un marcado descenso de los anticuerpos IgG. En los niños de 18 meses de edad, la media geométrica de los anticuerpos IgG anti-*B. pertussis* representa el 6,6% de la media de anticuerpos encontrados en el pico máximo, a los doce meses de edad. A partir de los 18 meses de edad, es decir, después de once meses de finalizar el calendario de vacunación, los niveles de anticuerpos descienden de forma lenta y progresiva hasta los cinco años de edad. El descenso se produce tanto en

las prevalencias como en las concentraciones de todos los isotipos. Lógicamente, esta disminución es más marcada en el isotipo IgG. Otros autores encuentran resultados parecidos al estudiar la evolución de los títulos de anticuerpos producidos por las vacunas con bacterias completas (73,267,274).

Una respuesta similar, también, ha sido observada en las inmunizaciones llevadas a cabo con vacunas acelulares preparadas con factor promotor de la linfocitos o toxina pertussis y hemaglutinina filamentosa (143,281,285,302). En las vacunas acelulares preparadas solamente con toxoide pertussis este descenso fue más precoz, observándose a los 4 meses de finalizar la segunda dosis en los voluntarios adultos que habían recibido sus inmunizaciones con vacunas celulares durante su infancia (305).

Al igual que ocurría con los anticuerpos cedidos por la madre al niño, la función que mejor define la evolución de anticuerpos después de finalizar las vacunaciones es, también, de tipo recíproco.

#### 5.2.5.- Eficacia de la vacuna

Para poder efectuar una evaluación de los riesgos y beneficios proporcionados por las vacunaciones es importante estimar el impacto que sobre la salud tienen las infecciones por *B. pertussis*.

La medida de la eficacia de una vacuna requiere la comparación de la incidencia de la enfermedad en dos grupos igualmente expuestos al agente infeccioso, estando los individuos de uno de los grupos vacunados. Aunque existen varios métodos para la evaluación de la eficacia de una vacuna (293), el más utilizado consiste en estimar el porcentaje de reducción de la mortalidad/morbilidad en los individuos vacunados con respecto a sujetos similarmente expuestos y no vacunados (38,216,217,310-313).

Estimar la eficacia de la vacuna contra la tosferina entraña enormes dificultades. Uno de los inconvenientes encontrado en países como el nuestro (en que la aceptación de los calendarios de inmunizaciones es muy importante, excluyendo la población marginal)(87), es que la población está vacunada. Por tanto, no se pueden hacer estimaciones, aunque fueran aproximadas, de las tasas de ataque en sujetos no vacunados. Se podría utilizar para el cálculo de la eficacia de la vacuna, las tasas de ataque en los lactantes menores de tres meses, o las tasas de ataque en los sujetos mayores de 25 años (que no habrían podido recibir ninguna dosis), pero ésto distorsionaría las estimaciones ya que la incidencia de la enfermedad varía según los grupos de edades. Por otro lado, en nuestros días, no sería ético realizar este tipo de estudio dejando un grupo de lactantes sin vacunar e ir observando las tasas de ataque de tosferina a lo largo de su infancia. Una excepción a este principio ético es la situación actual planteada en Suecia a partir de 1979, cuando se suprimió la obligatoriedad de vacunar contra la pertussis (75). En estas condiciones si resulta ético y se han realizado y se están realizando estudios sobre la eficacia de las distintas vacunas acelulares, vacunando a un grupo de

lactantes y dejando de vacunar a otro grupo de lactantes de la misma edad (209,265).

Otro problema importante es la gran dificultad existente en la estimación de las tasas de ataque. Estas variarán ampliamente dependiendo de las premisas de partida para la definición de caso de tosferina (15,217,225,265,293,312). La mayoría de los estudios sobre la eficacia de la vacuna contra la pertussis no reconocen las infecciones subclínicas, con lo que se sobrevalora la eficacia de la vacuna. Quizá habría que distinguir dos tipos de eficacia en la valoración de la protección conferida por las vacunas: eficacia contra la enfermedad y eficacia contra la infección. Fine y Clarkson (216) recomiendan estudiar la eficacia de la vacuna no en términos de protección contra la enfermedad, sino en términos de protección contra la infección.

Las tasas de ataque serán muy bajas si únicamente se admite el diagnóstico bacteriológico, supervalorándose la eficacia de la vacuna. Lo contrario puede ocurrir si se acepta el diagnóstico clínico, más o menos exigente, para la aceptación de caso de pertussis. En la mayoría de los casos clínicamente estudiados puede haberse utilizado una definición de caso no muy específica, particularmente en períodos con baja incidencia de la enfermedad (311).

Otra variable a tener en cuenta en la valoración de la eficacia de una vacuna es la heterogeneidad de los distintos preparados. La eficacia de una vacuna variará en función del contenido antigénico de la cepa o cepas de *B. pertussis* utilizadas en su fabricación, así como en la forma de preparación de la vacuna, adsorbida o no



(265,289). Preston considera esencial la presencia del aglutinógeno tipo tres en las cepas utilizadas para la obtención de una protección eficiente contra la enfermedad (289).

Como se puede desprender de estos breves comentarios, la valoración de la eficacia de una vacuna es muy subjetiva y variable dependiendo de los criterios manejados para la aceptación de la definición de caso, no existiendo un criterio único para su valoración, tanto con las vacunas celulares como con las acelulares (65).

La utilización del criterio serológico obvia las desventajas de las dificultades existentes en el aislamiento de la bacteria en los sujetos vacunados (46,314,315) y en la definición de pertussis para la aceptación del diagnóstico clínico (284). Aunque no hay que olvidar que todavía no se ha podido relacionar unas concentraciones de anticuerpos con la protección contra la enfermedad (por lo que niveles mayores de anticuerpos en respuesta a la vacuna no son sinónimos de mayor eficacia de la misma)(128, 303), el diagnóstico serológico presenta la ventaja de detectar tanto las infecciones clínicas, como las subclínicas o asintomáticas, y de estimar la eficacia de la vacuna en función del tiempo transcurrido desde la finalización del calendario de vacunaciones, mediante cortes transversales por grupos de edades. Esta estimación se acercará más a la realidad de la eficacia de la vacuna, que una estimación global realizada sobre amplios grupos de edades, en donde se encuentran englobados los niños que han finalizado su calendario de vacunaciones hace unos meses, con niños mayores que han finalizado su calendario hace ya varios años y en donde, lógicamente, los títulos de anticuerpos habrán descendido y la eficacia de la vacuna

será menor. Estos estudios transversales presentan el inconveniente de no poder tener en cuenta la posibilidad de infecciones previas. Los estudios longitudinales obvian parte de estos problemas, máxime si están realizados por un único autor, pero tienen que asumir la inexistencia de cambios en la población durante el período de estudio, además de la enorme dificultad que entraña el desarrollo de un estudio de este tipo.

En el estudio desarrollado en el Area 10, no se detectó ningún caso con criterio serológico de tosferina en los niños menores de tres años integrantes de la cohorte de referencia. Así pues, podemos estimar una eficacia de la vacuna contra la infección del 100% hasta los 29 meses, aproximadamente, de finalizar el calendario de inmunizaciones. A partir de los tres años de edad comienzan a detectarse niños con serologías compatibles con infecciones por *B. pertussis* (tabla 4.36), lo que hace descender, la eficacia de la vacuna hasta un 74,5%-88,5% en los niños de tres años de edad. Al año siguiente la protección conferida por las vacunaciones disminuirá, encontrándose nuevos casos de pertussis. A los cuatro años de la finalización del calendario de vacunaciones, la eficacia de la vacuna oscilará entre 62,9% y el 73,5%. Estas cifras son similares a las referidas en distintos estudios, como el de Palmer (293) (basado en criterios clínicos e incluyendo todos los casos clasificados como definitivo, probable y posible) en niños entre uno y seis años, vacunados con bacterias completas, o los estudios llevados a cabo por otros autores u organismos oficiales (11,17,18,23,27,32,64, 68,76,216,217,224,227,287,288, 313,315-317). Cifras más bajas de eficacia en la vacuna contra la tosferina también han sido comunicadas utilizando distintos criterios de definición de caso (38,73,265).

En el grupo de niños con edades comprendidas entre los cinco y los diez años, la eficacia de la vacuna se encuentra entre el 43,7% y el 51,7%. A los 15 años, la eficacia de la vacuna estará entre un 38,2% y un 44,6%. Básicamente, estas estimaciones no difieren de las realizadas por Jenkinson en Inglaterra entre 1977 y 1987 en sujetos que habían recibido cuatro dosis de vacuna celular completa junto a los toxoides tetánicos y diftéricos, estratificando los niños por grupos de edades y utilizando el diagnóstico clínico para definir el caso (224). Granström y col. (48) señalan que, con el esquema de inmunizaciones de tres dosis de DTP en lactantes y sin la dosis de recuerdo a los doce meses de la tercera dosis (como en un principio se hacía en Suecia y actualmente en Inglaterra), no se aporta una protección sustancial contra la enfermedad más allá de los ocho años de edad.

Por último, recordar que la inmunidad conferida por la vacuna es de una duración más corta que la producida por la infección, así como que la vacuna es más eficaz protegiendo contra la severidad de la enfermedad que contra la infección (3,24,38,40, 75,76,216,217,319). Esto hay que tenerlo presente a la hora de plantear estrategias contra la tosferina. La eficacia de la vacuna en la mayoría de los artículos viene expresada en términos de protección contra la enfermedad, más que contra la infección. *Por tanto, controla la enfermedad pero no la erradicación de la infección.* Si la meta de la vacunación es reducir la morbilidad, lo que se necesita es una vacuna eficaz para prevenir la enfermedad. Si se quiere evitar la transmisión y ,posteriormente, erradicar la enfermedad, se tendría que considerar la eficacia de la vacuna en términos de protección contra la infección.

#### 5.2.6.- Reacciones adversas de las vacunas con bacterias completas

La vacuna triple (DTP) con *B. pertussis* es efectiva para la prevención, al menos, de la enfermedad, durante un período de tiempo limitado. El inconveniente que tiene la vacuna con bacterias es la dificultad en conseguir un proceso de fabricación uniforme, pudiendo contener cantidades variables de impurezas que no han podido separarse eficazmente de los componente inmunogénicos (320), adyuvantes, así como cantidades variables de los antígenos diferentes de *B. pertussis*. De ellos, unos pocos son necesarios para la protección y muchos otros son tóxicos y responsables de los efectos indeseables, como los lipopolisacáridos (284). Por tanto, no hay base científica, antes del uso de la vacuna, para valorar la actividad y seguridad de la misma (320).

No obstante, las preocupaciones nacidas por las reacciones indeseables observadas y asociadas con la vacuna (321-325), así como el incremento de las demandas judiciales solicitando indemnizaciones (326-328) han originado la búsqueda de vacunas menos reactogénicas y compuestas por los antígenos necesarios para proteger contra la enfermedad.

La reacción adversa más preocupante y generadora del mayor número de acciones judiciales fue el daño cerebral (329,330). Hubo gran controversia en la literatura sobre el papel desempeñado por la vacuna en la producción de encefalopatía. Algunos autores consideran que se produce déficit neurológico permanente en 1 de cada 310.000 dosis de vacuna (329-333). Pittman (9,135)

atribuye la alteración neurológica , posiblemente, a la hipoglucemia causada por la toxina pertussis. Sin embargo, esta hipótesis parece ajustarse más a modelos de animales (ratón), pero no se ha podido demostrar en humanos (334). Las hipoglucemias que se vieron en los años 40 se pueden atribuir a las bajas condiciones sociales y no a la acción de la toxina pertussis. La mayoría de los estudios realizados al respecto no pueden demostrar una relación causal entre vacunación y daño neurológico permanente (287,323,335-342).

Las reacciones adversas de la vacuna están más estrechamente relacionadas con la edad del lactante en el momento de la inmunización que con el número de dosis de vacuna (3,343). Barkin y col.(280), reduciendo las dosis de las vacunas a la mitad, encontraron la misma respuesta de anticuerpos pero con menos efectos secundarios.

Las reacciones adversas más frecuentes de la vacuna con bacterias completas son dolor local (92%), irritabilidad (77%), somnolencia (54%), llanto (38%) y fiebre superior a 38°C (31%)(154). Las convulsiones son más frecuentes en lactantes con predisposición a presentar convulsiones febriles. El 6% de las convulsiones febriles ocurren asociadas a la vacuna, produciéndose entre el tercero y séptimo día después de la vacunación (336). Cody y col.(322) y Blumberg y col. (334) refieren una convulsión por cada 1750 dosis de vacuna; la misma frecuencia encuentran para la hipotonía e hiporreflexia. Con la excepción de la endotoxina, no se pueden atribuir las reacciones adversas de la vacuna a ninguno de los otros factores elaborados por

*B. pertussis* (334). Las reacciones locales suelen alcanzar su pico máximo a las seis horas después de la dosis, las reacciones sistémicas lo alcanzan a las 24 horas (344)

### 5.3.- Vacunas acelulares

El origen de las vacunas acelulares se encuentra en Japón. En este país, se empezaron las vacunaciones con bacterias en 1947 con una aceptación social del 80%. En 1975, el porcentaje de vacunaciones cayó al 20% como consecuencia de los efectos indeseables de esta vacuna, retrasándose el comienzo del calendario de inmunizaciones, de los tres meses, a los dos años. En 1981, la vacuna acelular reemplazó a la vacuna con bacterias completas, no modificándose la edad de comienzo de las inmunizaciones (74,265).

La ausencia de información sobre los antígenos necesarios de *B. pertussis* para proteger contra la enfermedad ha dado lugar a la aparición de varios tipos de vacunas acelulares (300), todas ellas menos reactogénicas que las vacunas constituidas por bacterias (143,267,295,298,300,322,344-6). Existe una práctica unanimidad de criterios en lo referente a la inclusión de la Toxina Pertussis y Hemaglutinina Filamentosa en la composición de la vacuna acelular (344). Las vacunas con un sólo componente suelen ser menos eficaces (65,128). No obstante, como no se conoce todavía qué componentes de la vacuna, ni qué niveles de anticuerpos son necesarios para proteger contra la infección (338), se recomienda la inclusión de otros antígenos bacterianos en la elaboración de las vacunas acelulares, tales como el pertactin, antígenos fimbriales, etc (63,128,211,263,303,336).

Una excepción a esta línea de pensamiento se encuentra en Robbins y col.(295), que al atribuir todo el poder patogénico de la enfermedad a la toxina pertussis, preconizan la exclusiva utilización de esta sustancia en la vacuna acelular, puesto que la adición de otros antígenos no proporcionaría mayor eficacia y sí puede originar mayores reacciones adversas y/o más intensas. Cherry (336) no atribuye el poder patogénico de *B. pertussis* a la toxina pertussis, exclusivamente. Basa su razonamiento en que la vacuna bacteriana produce pocos anticuerpos anti-toxina pertussis y sin embargo es eficaz protegiendo contra la enfermedad. Lo mismo se puede decir de otras vacunas acelulares productoras de escasos anticuerpos anti-hemaglutinina filamentosa. Todos estos datos en su conjunto sugieren que los anticuerpos dirigidos contra otros antígenos de *B. pertussis* pueden ser importantes en la protección contra la enfermedad, tales como el pertactin y los aglutinógenos.

Mientras que para algunos autores la eficacia de la vacuna acelular es prácticamente igual a la vacuna celular (284), para otros es superior, produciendo respuestas de anticuerpos más intensas (303), y para otros esta eficacia es inferior (77,140,282,319,336). Glode y col.(300) y Lewis y col.(345), utilizando la vacuna celular y la acelular como dosis de recuerdo, encuentran la misma respuesta de anticuerpos contra la toxina pertussis, aglutininas y el pertactin. Generalmente, la vacuna acelular (con gran contenido en toxina pertussis) provoca una mayor síntesis de anticuerpos anti-toxina pertussis (281,344).

El que no esté claro si la inmunidad conferida por la vacuna acelular es comparable a la producida por la vacuna celular ha influido para que, hasta la fecha,

la administración americana (FDA) haya aprobado el uso de las vacunas acelulares únicamente como dosis de recuerdo (296-298).

El estudio de la eficacia de las vacunas acelulares presenta las mismas limitaciones que el estudio de eficacia de la vacuna bacteriana, con la única excepción de que en las vacunas acelulares se sabe exactamente la composición y concentración de sus antígenos. Así pues, dependerá de los criterios seleccionados para la definición de caso, del tiempo transcurrido desde la última dosis, de la composición de la vacuna acelular, calendario de inmunizaciones, etc. Globalmente y de forma resumida se puede decir que la eficacia de la vacuna acelular es similar a la vacuna bacteriana, cercanas al 80% (65,143,265,319,347,348)

En lo referente a las reacciones adversas de las vacunas acelulares, parece no existir la menor duda de la importante disminución en el porcentaje e intensidad de los efectos indeseados: fiebre, dolor, llantos prolongados, interrupciones del sueño, alteraciones del sistema nervioso, etc. Lógicamente, la utilización de material antigénico purificado en las vacunas acelulares excluye la presencia de impurezas que pudieran encontrarse en las vacunas celulares (290,320,327-330,349). No obstante, hay que prestar una especial atención a la posible recuperación de la actividad tóxica del toxoide pertussis en vacunas acelulares elaboradas por medios químicos (284,305,319). La recuperación de la actividad tóxica podrá dar lugar a las mismas complicaciones severas asociadas con las vacunas celulares y atribuidas a trazas de toxina pertussis activa (117). Estas complicaciones pueden obviarse obteniendo la toxina pertussis de cultivos con *B. pertussis* mutadas y productoras de



la subunidad S1 inmunológicamente indistinguible de la toxina pertussis original pero un millón de veces menos tóxica (137,350,351)

#### 5.4.- Valores de referencia

Una de las dificultades, que existe en la interpretación de una prueba de laboratorio, reside en definir una referencia óptima con la que poder efectuar la comparación de los resultados suministrados por la prueba.

En la producción de los valores de referencia deberá tenerse en cuenta (352):

- 1º Los criterios de salud que caracterizan a los individuos de referencia.
- 2º Los factores de variación biológica que eventualmente pueden exigir la estratificación de la muestra de referencia, estimando los valores de referencia por cada grupo.
- 3º Control riguroso y continuo de la calidad analítica utilizada.
- 4º La aplicación de métodos estadísticos apropiados en la obtención de los valores de referencia.

Particularizando en el tema que nos ocupa (la utilidad de la serología en el estudio de las infecciones causadas por *B. pertussis*), la primera dificultad se encuentra (aparte de los problemas metodológicos) en tener la certeza de no estar incluyendo sujetos con infecciones subclínicas (totalmente asintomáticos pero con

respuesta humoral) en la cohorte de referencia. En este trabajo no se descartaron los casos compatibles con serodiagnóstico de pertussis para la obtención de los rangos de referencia porque estos representaban menos del 11% para la IgG y menos del 9% para los otros dos isotipos. La repercusión de la inclusión de estos casos serológicos sobre los más de 1.000 sujetos utilizados para obtener el rango fue mínima. Por otro lado, cuando se produce una infección, la respuesta de anticuerpos suele ser importante, sobrepasando ampliamente el límite de la distribución de referencia. Así pues, con los valores de referencia seleccionados se gana especificidad sin perder sensibilidad.

Por último, decir que los conceptos de sensibilidad y especificidad arriba mencionados están utilizados en un sentido genérico y no diagnóstico. Los conceptos de sensibilidad y especificidad diagnóstica, así como, los valores predictivos y eficacia diagnóstica de una prueba necesitan del conocimiento certero del estado de salud de los sujetos incluidos en cada cohorte (252). Debido a las características tan peculiares de las infecciones causadas por *B. pertussis*, en la actualidad carecemos de una prueba (con una seguridad aceptable para la selección de los sujetos) con la que poder comparar el rendimiento diagnóstico de las pruebas serológicas. La prueba de referencia, el cultivo, posee una escasa sensibilidad.

#### 5.5.- Prevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* en la cohorte de referencia

La prevalencia de anticuerpos anti-*B. pertussis* variará ampliamente dependiendo del grupo de edad considerado, del isotipo medido y de la dilución

inicial de la muestra. Partiendo de una dilución inicial 1/10 y teniendo en cuenta únicamente el isotipo IgG, cabe destacar la alta seroprevalencia en neonatos (83,9%), reflejo de la seroprevalencia materna (83%) (204), que rápidamente va disminuyendo para alcanzar su nadir en los lactantes de dos a tres meses de vida (18,3%). Con el comienzo del calendario de vacunaciones se producirá el incremento esperado de la seroprevalencia del isotipo IgG, estando presente en el 100% de los lactantes de 10 a 12 meses de edad. Después seis meses de haberse alcanzado el cenit de la seroprevalencia, ésta disminuirá hasta algo más del 50% (55,2% - 58,9%) continuando prácticamente inalterable hasta el grupo de niños con edades comprendidas entre los cuatro y cinco años, en donde sólo se podrá detectar anticuerpos IgG anti-*B. pertussis* en el 36,7% de los sujetos. Estos datos son similares a los hallados en la Encuesta Seroepidemiológica en la Comunidad de Madrid (87), llevada a cabo en 1988 y donde la metodología utilizada fue un ELISA con bacteria completa. La seroprevalencia global referida para el grupo de edad de 22 a 35 meses (55,6%) no difiere de la encontrada en este trabajo (57.1%), con distinta metodología y distinta procedencia de la muestra. Los autores que elaboraron la Encuesta de la Comunidad de Madrid se planteaban una serie de preguntas, algunas de las cuales serán comentadas en los apartados correspondientes de esta discusión. Una de ellas, recogida en la página 114 dice textualmente:

*"La discrepancia encontrada entre el nivel de vacunación frente a tos ferina (97.1%) y la seropositividad (55.6%) no es fácilmente explicable con los datos disponibles en el estudio, si bien existen diversos factores, no excluyentes entre sí, que podrían al menos en parte, justificarla:*

---

- Deficiente cumplimentación de la cartilla de vacunación.

- No se puede descartar del todo alguna posible implicación técnica...
- Por último queda por considerar la existencia de posibles problemas con la potencia de la vacuna anti-Pertussis que en su momento fue aplicada a la población investigada. Debe tenerse en cuenta que esta vacuna presenta una relación potencia-eficacia muy ajustada, de forma tal que, a diferencia de otras vacunas, una pequeña pérdida en la potencia afecta de forma importante a la eficacia, ya de por sí nunca superior al 80%. Por otro lado, la potencia no puede aumentarse por el riesgo de aparición de reacciones adversas."

De lo referido en el apartado 5.2.4 (Duración de la respuesta de anticuerpos evocados por las vacunaciones) y 5.2.5 (Eficacia de la vacuna) de la discusión, no parece que exista ningún problema con la vacuna de la pertussis que en su momento fue aplicada. La caída de anticuerpos es rápida después de los cinco meses de finalizar el calendario de vacunaciones, siendo este descenso muy acusado en los primeros seis meses siguientes de haberse alcanzado el cenit de la respuesta (12-18 meses). Por otro lado, como se vio en el apartado 5.2.5. (eficacia de la vacuna) las vacunas bacterianas de pertussis parecen no producir una inmunidad completa más allá de los dos o tres años de su finalización (287,353).. Desgraciadamente, no se piensa que las vacunas acelulares estudiadas hasta ahora vayan a mejorar esta eficacia.

El valle de la seroprevalencia de niños con IgG anti-*B. pertussis* se observa entre los cuatro y cinco años de edad. Se puede pensar que hasta esta edad los

anticuerpos detectados son debidos a la inmunidad conferida por la vacuna, que se ha ido desvaneciendo con el paso del tiempo desde la última dosis, aunque teniendo en cuenta los otros isotipos como marcadores de infección natural, ya a partir de los tres años de edad existe evidencia serológica de infección natural por *B. pertussis* (tabla 4.36). Así pues, entre los tres y cinco años comienzan a encontrarse niños con una inmunidad post-vacunal que se va debilitando y un pequeño porcentaje de otros niños que ya están infectándose con *B. pertussis*. Sería interesante realizar un estudio longitudinal para investigar si este porcentaje (5,6% a 18,5%) de niños de tres a cinco años, con evidencia serológica de infecciones naturales, podría ser una parte de esos lactantes que respondieron con una escasa respuesta de anticuerpos a la inmunización primaria 27,2% (I.C.95%: 19,6%-34,8%).

Entre los cinco y diez años de edad se produce un incremento de la seroprevalencia como consecuencia de las infecciones naturales, que actúan como dosis de recuerdo. La seroprevalencia de IgG en este grupo de edad (47%) no difiere de la referida en la Encuesta Seroepidemiológica de la Comunidad de Madrid (44,5%). Unicamente estos dos grupos de edades se pueden comparar por no presentar la Encuesta de la Comunidad de Madrid datos sobre los dos grupos de adultos estudiados. Pero con los dos grupos de niños comparados y con unas seroprevalencias prácticamente iguales, se puede contestar al punto 11 de sus recomendaciones. En este punto se dice:

*11 Es necesario también realizar un estudio de las características de las poblaciones que acuden a centros hospitalarios y centros de atención*

*primaria, en relación con la población general. Este estudio permitiría conocer cuál es la población idónea para la realización de estudios seroepidemiológicos futuros.*

Teniendo presente que el estudio de la Comunidad se realizó en Centros de Atención Primaria de la Comunidad de Madrid y que este estudio se realizó en sujetos que acudieron al Centro Hospitalario del Area 10, se puede decir que no parece existir diferencia serológica entre los dos tipos de poblaciones estudiadas, al menos en lo referente a la tosferina.

En el grupo de niños entre los 10 y 15 años se vuelve a encontrar otro valle de seroprevalencia. Este segmento post-vacunal poblacional presenta el porcentaje más bajo de serología compatible con una infección por *B. pertussis*. Posiblemente, en este intervalo de edad se hallan los niños que han tenido una infección natural a edades más tempranas (cuando se desvaneció la inmunidad aportada por la vacuna) y llegan a esta edad con una inmunidad activa contra la infección. Por tanto, no son susceptibles a un nuevo estímulo antigénico que les provoque un incremento en los niveles de anticuerpos.

A partir de los 15 años de edad, la circulación de *B. pertussis* entre los adolescentes y adultos parece ser extremadamente importante, teniendo en cuenta la alta seroprevalencia de anticuerpos (63,8% a 70,6%) en todos estos grupos de edad (51). Aproximadamente, el 20% de los sujetos mayores de quince años de la cohorte control presentan una serología compatible con una pertussis. Esto lleva a

plantearse el papel jugado por los adolescentes y adultos como reservorio, y en la propagación y mantenimiento de las infecciones producidas por una de las bacterias con mayor contagiosidad conocida hasta la actualidad (17,20,21,69). También sería interesante estudiar la duración de la inmunidad producida después de una infección natural. Hasta hace pocos años se decía que la inmunidad conferida por la infección natural duraba toda la vida. Con los resultados obtenidos en este grupo de edad y con un caso de tosferina re infectado a los 24 meses y que se expondrá más adelante, parece que la inmunidad humoral conferida por la infección natural, aunque de mayor duración que la provocada por las vacunas, puede empezar a desvanecerse en un período relativamente corto de tiempo, a partir de los dos o tres años de la anterior infección natural (15,27,31,32,48,66,73,169,260).

#### 5.5.1.- Papel de los adolescentes y adultos en la perpetuación de la pertussis

Antes de la introducción de la vacuna en los países desarrollados y actualmente en los países en vías de desarrollo, los lactantes y niños pequeños adquirirían la tosferina de otros niños (69). Después de la introducción y generalización de la vacuna, los lactantes y niños susceptibles se contagian, en gran medida, a través de un niño mayor o adulto (11,22,26,29-32,34, 40, 64,69,77,158).

Los pediatras e internistas no se plantean la pertussis en el diagnóstico diferencial de niños mayores o adultos con tos persistente (22,26,30,37), posiblemente, por tener la creencia que la vacuna, y sobre todo la infección natural, aporta una inmunidad que dura toda la vida del individuo (3,27,71,127). Esta falta de

reconocimiento constituye el mayor problema actual para intentar controlar la propagación de la enfermedad. Estos sujetos son, a menudo, diagnosticados de procesos respiratorios virales de vías altas no recibiendo la suficiente atención médica.

Desde la década de los ochenta se está detectando en los países desarrollados un incremento en la incidencia de tosferina entre los adultos y adolescentes (34,66,70,71,75,119), sugiriéndose el importante papel que éstos juegan como reservorio y transmisores de la infección a los individuos susceptibles (8,11,15,23-25,27,28,30-32,34,39,40,47,50-52,66,68,69,70,71,73, 78,82,123,127, 158,169,219,221,222,224,265,295, 305,336,338, 354,355). Este incremento de la incidencia de infecciones por *B. pertussis* en adolescentes y adultos pudiera estar mediatizado, además, por un aumento del número de las notificaciones al ser reconocidos los casos atípicos de la enfermedad que se manifiesta en los sujetos previamente inmunizados (30,34,229,356-358). Incluso asumiendo un incremento en el número de notificaciones de tosferina en los adultos (más adelante se trata el problema de la infranotificación de los casos de pertussis) Bass y Stephenson (33), en 1987, estimaron en 50.000.000 el número de adultos en USA susceptibles a la infección por *B. pertussis*. El problema para estimar la verdadera incidencia de la infección por *B. pertussis* en niños vacunados y adultos reside en la presentación clínica atípica (11-13,30,31,35-40) y en la escasa sensibilidad del cultivo en este segmento de la población, incluso con una tosferina excelente desde el punto de vista clínico y epidemiológico (29,172).



Utilizando la serología para el reconocimiento de las infecciones clínicas y subclínicas, Robertson y col.(28) encontraron en Australia un 25,7% de los 218 adultos con tos superior a un mes de duración y con una serología compatible con pertussis. En la cohorte control estudiada en el Area 10 de Madrid, el porcentaje de individuos mayores de 15 años con serología compatible de pertussis estuvo comprendido entre el 15% y el 20,8%. Cifras similares han sido notificadas por otros autores, con distintos programas de vacunaciones (tabla 5.1) (24,26,28,51,75). Así pues, se puede decir que en alrededor de un 15-20% de los adolescentes y adultos de la población estudiada se están produciendo infecciones periódicas con una bacteria que parece evocar una inmunidad natural temporal, manteniéndose endémicamente entre la población adulta y produciendo el cuadro clínico clásico cuando anida en un lactante o sujeto no vacunado susceptible.

Parece ser que el hombre es el único huésped natural conocido de *B. pertussis* (29,220). Sin embargo, los individuos asintomáticos portadores de *B.pertussis* en sus vías respiratorias son escasos (menos del 2% de los cultivos positivos) (50,51,73,114,169,172,220,260,313,359,360). La permanencia de la bacteria en estos sujetos fue transitoria, no habiéndose documentado casos de portadores crónicos (29,220,361). Loch y Keith han planteado la posibilidad de otros reservorios para *B. pertussis* (283).

No existe un acuerdo unánime en la necesidad o no de sintomatología en el portador para considerarlo contagioso (25,27). Algunos autores no consideran necesaria la presencia de síntomas clínicos para la transmisión de la infección

(64,174,216), mientras que otros consideran imprescindible la existencia de tos en el sujeto infectado para que pueda propagar la bacteria (29,40,42,50,114,219,260). A menudo, los casos considerados asintomáticos cuando se estudian cuidadosamente demuestran una tos persistente (28,31,32,76,355,362,363). Otros autores van más lejos afirmando la necesidad de un cuadro clínico clásico de pertussis para la difusión de la infección (219).

Como consecuencia del papel tan importante de los niños mayores, adolescentes y adultos en la propagación de la enfermedad, numerosos autores recomiendan el uso periódico de vacunas en estos segmentos de edad cuando se demuestre la existencia de una vacuna acelular segura y eficaz (15,25-27,265,283,338). El problema reside en el escaso conocimiento de la patogénesis de la enfermedad y del papel que la respuesta inmunológica juega contra los distintos componentes de la bacteria para prevenir su colonización y la enfermedad. Hasta la actualidad no se ha podido establecer una correlación entre el título de un anticuerpo específico contra alguno de los componentes bacterianos y la protección contra la enfermedad natural (319,348).

Algunos autores como Cherry y Bass admiten la posibilidad de la erradicación total de la tosferina con la utilización sistemática de la vacuna en adolescentes y adultos (336,361). Aunque teniendo en cuenta la alta contagiosidad de la bacteria, la clínica atípica o ausente evocada por la bacteria en vacunados, la dificultad diagnóstica, la corta protección obtenida con las vacunas actuales, etc, posiblemente lo único que se pueda conseguir es el cambio de edad en la incidencia de la

enfermedad, como el observado en países con una gran tradición en las inmunizaciones (19,76,215,283).

Tabla 5.1. Frecuencias estimadas de infecciones subclínicas en mayores de quince años.

País	Tasa de vacunación	Infecciones Subclínicas	Referencias
Italia	Baja	20,8%	Giamanco (51).
Suecia	Baja	14%.	Zackrisson (264).
		30%	Isacson (62).
		12%-19%	Mark (49).
Finlandia	Alta	22,6%	Mertsola (174).
Australia	Alta	26%	Robertson (28)
Japón	Alta	25%	Aoyama (22).
USA	Alta	20%	Steketee (127).
		11%-67%	Long (304,218).
		26%	Mink (24).
		29%-76%	Addis (25)
Inglaterra	Alta	20%	Thomas (76).
Area 10	Alta	14,3-20,8%	Tesis.
		(I.C. 95%;	1-B. 95%)

### 5.6.- Cohorte con sospecha clínica de pertussis

De los 162 sujetos remitidos con la sospecha clínica, en 51 (31,5%) se pudo demostrar por el laboratorio un diagnóstico compatible con la pertussis, en la mayoría de los casos por la serología. Este porcentaje no difiere del encontrado en otros países con índices bajos de vacunación o incluso sin vacunación, como Alemania (36), Italia (51) o Suecia (48), en donde los casos con sospecha clínica de tosferina presentaron una clínica no modificada por la vacunación. En el estudio realizado por Granström y col. (48) entre 1986 y 1987 sobre 300 pacientes con sospecha clínica de tosferina, sin vacunaciones previas, excepto ocho, [En Suecia se suspendió la vacunación en 1979 (75)], el médico aventuró un diagnóstico de pertussis en el 35% de los casos. Datos en este sentido son referidos por Heininger y col.(36) en Alemania sobre una muestra de sujetos no vacunados. Esto indica la enorme dificultad existente en la emisión de un diagnóstico clínico, máxime en niños vacunados que presentan una clínica atípica (13,38).

#### 5.6.1.- Descripción de la muestra

Algunas monografías sobre pertussis, Tratados de Medicina Interna y de Enfermedades Infecciosas refieren una mayor incidencia de la enfermedad en las niñas (3,9,10,14,364). En este estudio, al igual que en otros, no se pudo demostrar una mayor incidencia de la enfermedad en las niñas (25 niñas y 26 niños) (48,63,64,127,159,227). Farizo y col. encontraron un predominio del sexo femenino con tosferina en los adultos, entre los 20 y 29 años, atribuyéndolo a que, en esta

edad, hay un porcentaje mayor de mujeres trabajando con niños, y por tanto más en contacto con ellos (guarderías, colegios, cuidadoras, etc) (66). Otros autores no encuentran diferencia, o a lo sumo un ligero predominio del sexo femenino (52%) pero sin que llegue a tener significación estadística (38,40,64,227).

#### 5.6.2.- Distribución de las peticiones por grupos de edades

La mayor demanda de estudios de laboratorio para la confirmación del diagnóstico de pertussis se hizo sobre el grupo de edad comprendido entre los cinco y los diez años 29.6% (48/162) y en los lactantes menores de seis meses 28,5% (46/162). Esta demanda coincide con los picos de incidencia de tosferina esperada en un país con altas tasas de vacunación (38,66,114, 168), demostrando la corta protección conferida por la vacuna. En países con bajas tasas de vacunaciones contra la tosferina, la incidencia máxima de pertussis corresponde a los niños con edades comprendidas entre el año y los cuatro años, es decir, el mismo pico de incidencia de la enfermedad que antes de la introducción de la vacuna (34,64,66,69,70,71,75,76,227). La mínima demanda se hizo en lactantes vacunados, mayores de seis meses, y niños menores de tres años (entre un 1,8% y 2,5%) (tabla 4.37)

#### 5.6.3.- Eficacia del diagnóstico clínico de pertussis por edades

De los resultados expuestos en las tablas 4.38 se deduce que la máxima eficacia diagnóstica se obtuvo en los niños mayores, entre los 5 y los 15 años. Cerca

del 50% de los casos remitidos para estudio serológico de pertussis fueron confirmados. Parece ser que a estas edades los pediatras van a tener menos dificultades en establecer un diagnóstico diferencial.

No se puede decir lo mismo de los lactantes menores de seis meses, ni del grupo de niños con edades comprendidas entre los 3 y los cinco años. En éstos, los facultativos tuvieron mayor dificultad para emitir un diagnóstico de presunción. La sospecha clínica de pertussis pudo ser confirmada en el 20-25% de los casos remitidos. En los lactantes y niños pequeños, los datos epidemiológicos tienen poco valor diagnóstico por la excesiva especulación que se hace del diagnóstico de pertussis (48). La sintomatología atípica que pueden presentar estos lactantes o niños pequeños (15,70,168), la preocupación y ansiedad de los padres y pediatras que les incita a la intervención inmediata, buscando una etiología para el proceso (1), los numerosos agentes infecciosos, víricos en su mayoría, que provocan cuadros parecidos a pertussis (1,11,13,47,49,158,159,172), etc. hacen que el porcentaje de confirmaciones por el laboratorio del diagnóstico clínico sea más bajo que en los niños mayores, entre un 20 y un 25%. Los pediatras, en estos grupos de edades (lactantes y niños pequeños) suelen realizar la sospecha de pertussis por la calidad de la tos, síntoma con escasa especificidad (24,159, 363) sin esperar a que la tos tenga una duración superior a 7, 14, 21 o más días requeridos para aportar especificidad al diagnóstico clínico, (11,38,39,61,64,65,128, 159,227,293,363).

#### 5.6.4.- Rendimiento diagnóstico de los síntomas

La frecuente ausencia de la sintomatología típica de la tosferina (ataques de tos paroxística con estridor laríngeo y/o vómitos post-tusivos) en neonatos y lactantes, así como la sintomatología atípica o atenuada de los niños vacunados, adolescentes y adultos hace extremadamente difícil e inexacto el diagnóstico de la enfermedad (13,209).

El síntoma más característico, la tos, tiene algún valor diagnóstico en períodos epidémicos por su duración aunque no por sus características (36,49,363). Pero incluso la duración de la tos tiene una calidad diagnóstica bastante discreta, disminuyendo notablemente la especificidad con los aumentos de sensibilidad que se originan al reducir el tiempo de evolución de la tos. Patriarca y col, hallaron el máximo rendimiento diagnóstico a una tos con una duración superior a los 14 días y en períodos de brote epidémico comprobados, con una sensibilidad del 84% y una especificidad del 63%. La calidad diagnóstica de la tos fuera de períodos epidémicos es desconocida (65,363).

Otras características de la tos como los paroxismos o la interrupción del sueño por los ataques de tos no mejoran el rendimiento diagnóstico (363). Strebel y col.(159) señalaron dos definiciones de caso con utilidad clínica diagnóstica (Sensibilidad superior al 80% y especificidad superior al 50%) en lactantes y niños pequeños, no siendo aplicables a niños mayores, adolescentes y adultos:

1ª Tos con una duración superior a los 14 días y acompañada de estridor laríngeo.

2ª Tos con una duración superior a los 14 días más linfocitosis superior a 10.000/mm<sup>3</sup>.

En niños mayores, adolescentes y adultos, el espectro clínico es tan amplio que la definición más específica de caso sólo identifica al 41% de los seropositivos (365).

En la muestra remitida para el estudio de tosferina no se pudo demostrar una diferencia en la duración de la tos entre los que obtuvieron confirmación diagnóstica por el laboratorio y los que fueron negativos. En ambos grupos, el tiempo transcurrido desde el comienzo de la tos hasta la solicitud del estudio fue excesivo, 85,7 días en los casos afirmativos frente a los 109 de los casos negativos. La tardanza en pensar en la tosferina, no planteándose este diagnóstico hasta que otras etiologías han sido descartadas, pone de manifiesto la errónea creencia de la rareza de esta enfermedad en las personas vacunadas. En países con índices casi nulos de vacunaciones, como Suecia, estos tiempos son más cortos con una media de 6-7 días para los casos negativos y de siete para los positivos (48,366).

En los lactantes estos tiempos estuvieron muy acortados. Los casos afirmativos tuvieron una duración media de la tos de 15,2 días entre el comienzo del síntoma y la petición del estudio del laboratorio. En los casos negativos este tiempo



fue más corto, de 12,05 días. Menos de diez días transcurrieron en el 69,2% de los lactantes con resultado negativo. Esto demuestra la enorme preocupación que estos lactantes generan en sus pediatras, cuestionándose excesivamente este diagnóstico en los lactantes no vacunados o con el calendario de inmunizaciones primarias no finalizado. Mertsola y col., en Finlandia con tasas altas de vacunaciones, reportan una demora entre el comienzo de la tos y la petición al laboratorio de  $38 \pm 39$  días para niños entre los dos y 15 años. La demora fue de tan solo  $12 \pm 11$  días en niños menores de dos años (40).

No se pudo analizar la calidad de la tos por ser imposible recoger este dato por un único observador, presentando mucha subjetividad en la recogida de la encuesta. De cualquier modo, la característica paroxística de la tos parece carecer de valor descriptivo necesario para el diagnóstico (36). Sin embargo, una tos persistente, que empeora por la noche, o después del ejercicio o de la exposición a bajas temperaturas, debería levantar la sospecha de pertussis (40).

Tampoco se pudo demostrar un valor discriminante en la sensación de picor de gargantea en niños mayores. El síntoma predominante de los niños mayores y adultos, cuando existe, sería una tos persistente y productiva inicialmente que posteriormente se haría seca, remedando un proceso irritativo de vías altas (tos espasmódica, ronquera, etc.) (18,24,27,28,30,31,40,47,51,127,172, 218,221,359), siendo frecuentemente diagnosticados de proceso gripal o alérgico (40,265).

Los vómitos inducidos por la tos tampoco pudieron demostrar una utilidad diagnóstica. Estuvieron presentes en el 37,2% de los casos afirmativos frente al 43,2% de los diagnósticos negativos de pertussis. Este síntoma era referido en la mayoría de los lactantes y en la encuesta realizada a los padres era difícil precisar hasta que punto era un vómito provocado por la tos o una pequeña regurgitación posterior a la toma del biberón. Algunos estudios refieren el vómito con una frecuencia de alrededor del 80% en niños frente al 7% de los adultos (22,63), mientras que Granström y col. (48) lo refieren en el 17% de las pertussis y otros autores lo describen con la misma frecuencia en los casos positivos y negativos (49).

En ninguno de los casos de pertussis confirmados por el laboratorio se pudo observar una temperatura corporal superior a 37,5°C. La presencia de fiebre suele indicar en la mayoría de los casos infecciones de otra etiología, o una infección sobreañadida a una pertussis (36,51).

De los estudios hematológicos, la linfocitosis y eosinofilia presentan un valor diagnóstico positivo y negativo, respectivamente, estadísticamente significativo ( $t = 3,12$ ). Los sujetos con serología o cultivo positivo tuvieron un valor medio de linfocitos de 10.310/mm<sup>3</sup> frente a los 8.006/mm<sup>3</sup> de los casos negativos. La linfocitosis, junto con la tos, parece ser un parámetro sugerente de pertussis en niños (159,163). Aoyama y col. (22) señalaron la ausencia de linfocitosis en niños vacunados y adultos. En este estudio se observó linfocitosis en los niños vacunados con serología compatible de tosferina. Una posible explicación para esta discrepancia pudiera residir en el tiempo de evolución de la enfermedad cuando se extrajo la

sangre para el recuento celular. Mayor diferencia estadística ( $t = 5.30$ ) se observa con los eosinófilos. La presencia de una cifra de eosinófilos superior a  $330/\text{mm}^3$  parece excluir el diagnóstico de tosferina con un 95% de seguridad.

No se observó diferencia en las glucemias entre los casos positivos y negativos. El papel de la toxina pertussis en la provocación de hipoglucemia a través de la estimulación de los islotes pancreáticos fue vista por Pittman en ratones y en niños pequeños con unas condiciones sociales muy precarias. No se ha podido demostrar hipoglucemia provocada por la toxina pertussis en estudios posteriores, en donde se controló el estado nutritivo de los sujetos (3).

#### 5.6.5.- Estacionalidad de la demanda de estudios de pertussis

La mayoría de las enfermedades infecciosas en los climas templados están fuertemente influenciadas por los modelos estacionales. Las infecciones transmitidas por aerosoles están particularmente predispuestas a ciclos estacionales, con un aumento de la incidencia durante la última parte del año, al menos en los países del hemisferio norte, alcanzando el pico máximo en invierno o primavera. La pertussis presenta una serie de particularidades, poco conocidas, que hace que la preferencia estacional varíe con el tiempo y con los lugares. Después de la introducción de la vacuna contra la *B. pertussis* resulta más difícil observar la aparición periódica de los brotes epidémicos cada 3 - 5 años, así como definir los meses o estaciones del año donde la incidencia de pertussis es mayor (52,66,68,72,159,216, 295).

Una revisión de la literatura sobre este punto demuestra dos grandes patrones estacionales, con escasas excepciones, sin que se pueda explicar la causa epidemiológica de estos patrones y no pudiéndose descartar el sesgo introducido por las notificaciones médicas. Hay que recordar que en la mayoría de los países se admite el criterio médico como único requisito para la aceptación del caso de tosferina. En Estados Unidos y Canadá, la mayor incidencia de pertussis se registra en los meses de verano/otoño (23,25,30,38,64, 66,69,127,159,220,363), aunque se produzcan escasos brotes en otras estaciones (158,363). En Europa occidental, los picos de máxima incidencia tienden a presentarse en las estaciones de otoño/invierno (73,75,174,227,293).

Se realizó una revisión de todos los Boletines Epidemiológicos Semanales editados por el Ministerio de Sanidad y Consumo entre Enero de 1987 y Octubre de 1992 (367), buscando la estacionalidad del mayor número de casos de tosferina declarados en la Comunidad de Madrid. En 1987, el mayor número de declaraciones se hicieron entre la semana 1 con 109 casos y la semana 26 con 96 casos sobre un total anual de 4.628 casos notificados. En 1988, las declaraciones fueron muy similares a lo largo del año (entre 40 y 60 casos, aproximadamente), disminuyendo, prácticamente a la mitad entre las semanas 30 (32 casos) y la semana 37 (29 casos) sobre un total de 2.442 casos declarados. En 1989, las notificaciones fueron mayores entre las semanas 16 (151 casos) y 30 (93 casos) sobre un total anual de 4.338. Durante los años 1990, 1991 y 1992, las notificaciones anuales fueron bajas, entre 1.045 casos de 1991 y los 1510 casos a la semana 41 de 1992, sin que apenas se puedan demostrar unos picos de declaraciones, a lo sumo, en 1992 se pudo

observar un ligero incremento entre las semanas 21 (91 casos) y la 27 (62 casos). Por lo tanto, el mayor número de notificaciones se realizaron entre la semana 1 y la semana 26-30. En verano, la incidencia de pertussis desciende, manteniéndose baja durante el segundo semestre. Este patrón coincide con la demanda de estudios realizados en la cohorte con diagnóstico clínico de presunción de tosferina. De los 162 estudios demandados, 121 (74.7%) se hicieron en el primer semestre. Sin embargo, el mayor número de diagnósticos serológicos compatibles con una pertussis se produjeron entre Septiembre y Abril, ambos inclusive. El 47% de los casos positivos se obtuvieron entre los meses de Enero y Marzo, ambos inclusive. Un 29% se produjeron entre los meses de Octubre y Diciembre, ambos inclusive.

De todo esto se puede deducir que los facultativos sospechan más pertussis durante el primer semestre, quizá en esta época del año, los frecuentes procesos infecciosos respiratorios de la primera mitad del semestre y los procesos alérgicos de la primavera provoquen cuadros clínicos parecidos a una pertussis, de difícil filiación clínica sin la ayuda del laboratorio.

En España disponemos de datos sobre tosferina desde 1982, año en que la enfermedad fue considerada de declaración obligatoria (86). Con los datos obtenidos a partir de los Boletines Epidemiológicos y otros documentos editados por el Ministerio de Sanidad y el Servicio Regional de Salud de la Comunidad de Madrid (367-369) es difícil deducir los ciclos epidémicos producidos por la evolución secular de la tosferina (tabla 5.2). Se pueden observar un mayor número de declaraciones en algunos años (1982, 1985, 1986, 1987, 1989 a escala nacional), (1986, 1987, 1989

en la Comunidad de Madrid), (1989 en el Area Sanitaria 10), pero sin que se pueda definir una periodicidad, de 3 a 5 años, en los picos de incidencia de la enfermedad, cosa por otra parte lógica en países con alta tasa de vacunaciones como el nuestro y en parte, por el carácter endémico que esta enfermedad parece presentar a partir de este y otros estudios (38,51,70,220,222,336,338). La vacuna, al proteger contra la enfermedad más que contra la infección, altera el cuadro típico de la tosferina haciéndola irreconocible y no impidiendo la infección por esta bacteria altamente contagiosa, lo que se refleja en la alta seroprevalencia encontrada. No se produce el influjo necesario de sujetos susceptibles para la erupción de un brote epidémico (38,51,70,72,216,220,222).

Tabla 5.2. Casos notificados de tosferina en España.

AÑO	NACIONAL	C. MADRID	AREA S.10	ESTUDIO: TOTAL POSITIVOS (%)	
1982	50.463				
1983	35.437				
1984	35.928				
1985	60.564				
1986	55.846	9.562			
1987	26.958	4.609	5		
1988	14.506	2.445	61		
1989	33.212	4.414	101	46	4 (8,7)
1990	10.075	1.355	44	19	10 (52,6)
1991	8.365	1.072	40	26	12 (46,1)
1992		1.510*		71	25 (35,2)

\* Números de casos de Tosferina hasta la semana 41 de 1992.

#### 5.6.6.- Rendimiento del diagnóstico bacteriológico

Hasta que se alcance la practicabilidad en la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *B. pertussis* (182-187,370,371) , los dos únicos métodos bacteriológicos disponibles hasta la actualidad son el cultivo, considerado el método de referencia, y la polémica fluorescencia directa sobre especímenes nasofaríngeos.

##### 5.6.6.1.- Cultivo de *B. pertussis*

La meta analítica para el diagnóstico de la tosferina es el aislamiento en los especímenes nasofaríngeos de una de las bacterias con mayores dificultades para el crecimiento in vitro, *B. pertussis*. Frecuentemente, todos los intentos de aislamiento en casos clínicamente sospechosos de pertussis son infructuosos y desalentadores. La bacteria necesita unas condiciones exigentes del medio y tiene un crecimiento muy lento (113,120,217,228,372), además de los múltiples factores que inciden negativamente sobre su aislamiento, tales como evolución de la enfermedad (48,50,76,120,168,295,373), tratamiento previo del sujeto con antibióticos (38,46,116,120,373), vacunaciones previas del sujeto (46,120,199,209,217,228,315,373) etc, por lo que un resultado negativo no puede excluir el diagnóstico (39,54,66,113,118,161, 168,172, 365).

Incluso antes de la introducción de la vacuna y de la utilización indiscriminada de antibióticos, los porcentajes de aislamiento de *B. pertussis* nunca fueron del

100%. Durante la primera semana de la enfermedad, cuando todavía la tosferina es indistinguible de un proceso catarral, el porcentaje de aislamientos estuvo alrededor del 75%, disminuyendo progresivamente hasta la cuarta semana con un 5-32% de cultivos positivos, (15,295,365). Así pues, en la fase paroxística de la enfermedad, cuando el médico puede empezar a sospechar una pertussis, el porcentaje de aislamientos será muy bajo (48,50,168,295). Heininger y col. (36) refieren que el mayor porcentaje de aislamientos (59%) lo obtienen en especímenes recogidos antes de las dos semanas de evolución de la enfermedad y en sujetos no vacunados cuya tos tuvo una duración superior a las cuatro semanas. Sobre 3.629 muestras recibidas en diez meses de sujetos con sospecha clínica de pertussis (solamente el 7,6% vacunados) obtuvieron un 16,6% de cultivos positivos. En los sujetos vacunados el porcentaje de aislamientos fue del 3,3%.

En la muestra remitida para el estudio de tosferina se aisló *B. pertussis* en cuatro sujetos, lo que representa el 2,5% de los 162 pacientes enviados. Sobre los 51 sujetos con serología positiva de pertussis, el porcentaje de cultivos positivos representó el 7,7%. Los porcentajes de aislamientos reportados por otras serie varían ampliamente, dependiendo de la edad de los sujetos, vacunaciones, casi siempre referidos a brotes de pertussis, y sin tener en cuenta otras variables como demora en la toma de muestra, antibióticos, (36,38,51,70) . En sujetos menores de 14 años, como los estudiados en esta muestra, los porcentajes de aislamientos oscilaron entre el 0,45% reportado por Linnemann y col, sobre 1.102 sujetos (220) y el 67% de Biellik y col. (69). Los porcentajes más altos se obtienen en los lactantes y niños pequeños no vacunados, variando los aislamientos inversamente con la edad del sujeto y con



la evolución de la enfermedad, máxime si el sujeto está vacunado, llegando a ser los cultivos positivos prácticamente nulos en los adultos (22,25,36,49,58,114,118,140,159,168,172,208,218,219,363, 365) sobre todo en zonas donde *B. pertussis* es endémica (24,26,218).

De los cuatro cultivos positivos, dos correspondieron a lactantes, de tres y cuatro meses (el último con una dosis de vacuna) y con una evolución de la tos de 7 y 20 días, respectivamente. Curiosamente en este lactante de cuatro meses y con una dosis de vacuna, el crecimiento de *B. pertussis* tardó 11 días en el primo-cultivo y entre 5-6 días en los 4 pases periódicos que se hicieron posteriormente, no pudiéndose obtener un crecimiento a los tres días de incubación de la resiembra, tal como se observó con las otras tres *B. pertussis* aisladas. Desgraciadamente, se carecía de medios para efectuar un serotipo de las cepas aisladas por lo que no se pudo demostrar si este retraso se debió al tipo de cepa o a la única dosis de vacuna recibida. Hubo otros dos lactantes, de 5 y 7 meses de edad, con dos y tres dosis de vacuna respectivamente, sin tratamiento antibiótico previo, serología sugerente de pertussis y con cultivo negativo. En estos dos últimos lactantes, la enfermedad llevaba 1 y 2 meses de evolución cuando se les solicitó el estudio. Está ampliamente documentada la disminución de los aislamientos de *B. pertussis* en los sujetos vacunados con respecto a los no vacunados (120,199,209,217), pero en estos dos lactantes se produjo un retraso importante en la realización del cultivo.

Considerando los diez lactantes incluidos en el estudio con serodiagnóstico de pertussis positivo, el porcentaje de cultivos positivos aumenta a un 20%, cifra

inferior a la encontrada en otros estudios (67%) (69) y que seguramente sea la consecuencia del amplio uso de antibióticos que se realiza en nuestro medio, quizá por la ansiedad que genera este segmento de población. Seis lactantes con cultivos negativos y serodiagnóstico positivo estaban con tratamiento antibiótico, al menos 48 horas, cuando se les solicitó el estudio. Cuatro estaban tomando eritromicina, uno estuvo tomando amoxicilina y eritromicina y el sexto amoxicilina. Es decir, el pediatra se había inclinado por un diagnóstico de pertussis en el 83,3% (5 de los 6 lactantes con tratamiento antibiótico).

El tiempo transcurrido entre el comienzo de la sintomatología y la petición al laboratorio osciló entre los 3 y los 25 días, por tanto, en la mayoría de estos lactantes, presumiblemente, estos resultados bacteriológicos negativos son debidos al uso de antibióticos previos a la toma del espécimen nasofaríngeo, que como es sabido, inhiben el crecimiento de la bacteria (10,36,38,46,116,120,168), y en el caso de la eritromicina, puede eliminar *B. pertussis* de la nasofaringe en 48 horas (21,46,66,121,123,124).

Los dos cultivos positivos que se obtuvieron en niños mayores, correspondieron a dos niñas de 7 y 10 años, vacunadas. Ambas tenían en común el no estar tomando antibióticos y una evolución de la tos entre 4 y 7 días, es decir, en la fase catarral de la enfermedad. Estos dos cultivos positivos representan el 4,6% de aislamientos en niños vacunados, menores de 14 años, con serodiagnóstico de pertussis. No hace falta insistir en el efecto negativo que la edad, antibióticos y las vacunaciones tienen sobre el aislamiento de *B. pertussis* (38,46,116,120,199,209,217).

Pero lo que sí parece interesante es mostrar el amplio uso indiscriminado de antibióticos que los facultativos o padres hacen ante un síntoma como la tos, dificultando el diagnóstico bacteriológico. De los 39 niños con tratamiento antibiótico, en ocho de ellos el antibiótico administrado fue eritromicina, por lo que se puede suponer que en un 20% de los niños mayores seropositivos se sospechó la etiología. En el 50% de los sujetos el antibiótico empleado fue la amoxicilina, lo que parece confirmar la gran aceptación social de este antibiótico.

El hecho de que la repetición de la toma de especímenes en 3 a 5 días consecutivos incremente el porcentaje de aislamientos entre un 25% y un 35%, soporta la idea de la dificultad inherente a la toma de muestra (55,102,208,209,360). Por otro lado, algunos autores han encontrado mayor frecuencia de cultivos positivos, sembrando la torunda en medio de transporte (con 72 horas de incubación previa al pase a medio de aislamiento), además del de aislamiento en el momento de la toma (102,162,173,209,374). En este trabajo se siguió esta pauta de cultivos y no se obtuvo ningún aislamiento más de *B. pertussis*, que los obtenidos directamente por el medio de aislamiento. Lo que si se observó con cierta frecuencia fue el crecimiento de otras bacterias nasofaríngeas resistentes a la cefalexina en el medio de aislamiento selectivo sembrado a partir del medio de enriquecimiento y que no habían crecido en el medio de aislamiento selectivo de siembra directa (209). *Haemophilus* fue una de las bacterias más frecuentemente encontradas a partir del medio de enriquecimiento y con una morfología de sus colonias muy parecida a la de las colonias de *B. pertussis*. La aparición de colonias en las primeras 24 horas

siguiente a la siembra (frente a los más de tres días que tarda en crecer *B. pertussis*) hará pensar en *Haemophilus*.

#### 5.6.6.2.- Fluorescencia directa sobre especímenes nasofaríngeos

La fluorescencia directa para el diagnóstico de las infecciones producidas por *B. pertussis* surgió en la década de los sesenta en respuesta a la escasa sensibilidad y lentitud del cultivo (167). Una de sus principales ventajas es no necesitar bacterias viables para su realización, por lo que las demoras en la toma del espécimen no influyen tanto sobre el resultado como sobre el cultivo. Lo mismo se puede decir del tratamiento con antibióticos previo a la toma de la muestra. Por otra lado, la ejecución de la prueba, que no su lectura e interpretación, requiere un tiempo mínimo de atención técnica y en una hora se obtienen los resultados. Lo único que se necesita es un suero específico marcado con fluoresceína y un microscopio de fluorescencia.

En este estudio no se pudo identificar con seguridad ninguna *B. pertussis* o *B. parapertussis*, en los 162 especímenes analizados. Solamente en un espécimen correspondiente a un cultivo positivo pudieron identificarse dos formas bacterianas que podrían haber sido compatibles con *B. pertussis*. Las dificultades inherentes a la interpretación de esta prueba (localización de la bacteria, problemas de las adsorciones inespecíficas de los sueros a los detritus como moco, células, fibras de alginato, etc) se observan, incluso, en países con gran experiencia en esta metodología como Estados Unidos, y en período epidémico. Sobre 1.030 casos

declarados en un brote epidémico en Kansas en 1986, se obtuvieron un 4% de cultivos positivos y un 87% de especímenes con fluorescencia directa positiva, indicando la gran propensión a cometer errores del laboratorio (66). Sin embargo, a pesar de que su calidad analítica es actualmente muy discutida y cuestionada (34,54,66,115,118,120,160,168,171-174,180,207,365,372), Strebel y col., utilizando el cultivo como referencia durante un brote epidémico en Missouri, refieren una sensibilidad del 65% y una especificidad del 95%. Para la obtención de estos resultados emplearon un microscopista con más de quince años de experiencia, que leía cuatro pacientes a la hora (159).

Desde 1990, el CDC ha excluido la fluorescencia directa de la definición de caso para la notificación de la pertussis (61).

#### 5.6.7.- Diagnóstico serológico clínico de pertussis.

La presencia y replicación de un microorganismo dentro de un huésped está definida por el término infección. Dependiendo de la respuesta que el huésped desencadene contra el agente invasor, la infección se adjetivará como clínica o enfermedad, o como subclínica o asintomática. En este último caso, la reacción del huésped contra el agente infeccioso estará limitada a una respuesta inmunológica, solamente diagnosticable por métodos serológicos (67).

El diagnóstico serológico tiene en la sensibilidad su mayor ventaja sobre el diagnóstico bacteriológico, aunque, lógicamente, su especificidad no puede ser superior (48,118,120,172,180,209,212, 264,279,306,360).

Los viejos métodos serológicos como la aglutinación, fijación del complemento, neutralización, poseen poca sensibilidad diagnóstica, requiriendo, al menos, dos especímenes e importantes cambios de las magnitudes entre ellos, superior a 4 veces (174,199). El aumento de un isotipo de anticuerpo, por ejemplo la IgG, puede quedar neutralizado o enmascarado por la disminución de otro isotipo, como la IgM. Consecuentemente, se necesitarán períodos de tiempos más largos entre dos especímenes para poder objetivar la dinámica de la respuesta humoral, no pudiéndose distinguir entre la respuesta a la vacuna y la respuesta a la infección (50).

Los nuevos métodos serológicos que permiten descomponer la respuesta inmunológica global, estudiando la secuencia y evolución de los distintos isotipos de anticuerpos, aportarán mayor sensibilidad y rapidez diagnóstica a las pruebas serológicas. Las modificaciones en sentidos diferentes de los distintos isotipos de anticuerpos (IgM e IgG) no solo no restarán precocidad a la prueba, sino que la dotarán de una gran sensibilidad diagnóstica. En la mayoría de las ocasiones no se necesitarán dos especímenes para establecer un diagnóstico, y cuando éstos sean precisos, serán suficientes menores variaciones en las concentraciones o títulos de los anticuerpos.

Lo único que hará falta, será un conocimiento de la temporalidad, cinética y tipo de anticuerpos producidos en respuesta a la infección.

Para finalizar, la evaluación de una prueba serológica de pertussis es difícil por la ausencia de una prueba de referencia sensible y consistente con la que hacer la valoración. La prueba serológica ideal debería poder realizarse con una única muestra de suero, recogida justo en el momento de la presentación del paciente y siendo capaz de diferenciar entre los anticuerpos debidos a la infección natural y la inmunidad derivada de la vacunación (168). Como más adelante veremos, la inmunofluorescencia indirecta sobre *B. pertussis*, así como otros métodos serológicos modernos (enzimoinmunoensayos), van a cumplir con estos criterios, en la mayoría de las ocasiones (48,168,172,210,212,360).

Excepto en el 30% de los lactantes, en el resto de los sujetos fue suficiente un único suero para realizar el diagnóstico serológico de pertussis. La infección en los sujetos vacunados, con sintomatología atípica, ocasiona una importante demora en la sospecha de tosferina. Cuando los pacientes son remitidos al laboratorio ya han tenido tiempo de elaborar una respuesta serológica compatible con una infección por *B. pertussis*. Asimismo, la escasa y pobre respuesta de los isotipos IgA e IgM a las vacunaciones con *B. pertussis* va a permitir, en la mayoría de las ocasiones, diferenciar entre la respuesta humoral a las inmunizaciones y la respuesta humoral a las infecciones (114,168,308,309,360,375).

#### 5.6.7.1.- Enzimoinmunoensayos o inmunofluorescencia indirecta

Básicamente, estos dos tipos de metodologías poseen una sensibilidad analítica muy parecida (198,206). La elección de uno u otro método dependerá de la finalidad de su utilización.

Los enzimoinmunoensayos, al ser fácilmente automatizables, permiten procesar gran número de muestras en un corto período de tiempo, sin apenas necesitar la intervención de una persona. Sería el método ideal para los estudios epidemiológicos, en donde un importante número de especímenes se procesan en cada serie analítica. Por otro lado, la lectura fotométrica de la reacción evita la subjetividad de la persona que ejecuta la prueba. Sus inconvenientes residen en:

1º La necesidad de un número de especímenes mínimo para que la prueba sea rentable.

2º Los problemas de estandarización en cuanto a pureza, estabilidad, etc, de la o las sustancias que se utilizan como estándar y que dificulta la transferibilidad de resultados entre distintos laboratorios (209).

3º La utilización de los especímenes muy diluidos que miden la cantidad de anticuerpos pero no la afinidad de los mismos (381).

4º La necesidad de un sistema enzimático acoplado que produzca el revelado de la reacción antígeno-anticuerpo. Esto añade variabilidad a la prueba, pudiendo ser origen de errores importantes.



La inmunofluorescencia indirecta tiene la misma sensibilidad analítica que el enzimoimmunoensayo. Es la metodología ideal para la utilización con una finalidad diagnóstica, no necesitándose un número determinado de especímenes para obtener una ejecución rentable. Entre las ventajas que presenta, están:

1ª Utiliza la bacteria completa como sustrato, reproduciendo las condiciones naturales de la reacción huésped/invasor.

2ª No precisa estandarización al expresarse su resultado en títulos, es decir, en la dilución máxima del espécimen que produce fluorescencia. Por tanto, no existen problemas en la transferibilidad de resultados entre los laboratorios.

3ª La utilización inicial de sueros poco diluidos permite no sólo medir concentración, sino también la afinidad de los anticuerpos presentes en el espécimen.

4ª El marcaje del anticuerpo con el isocianato de fluoresceína, generalmente, evita la necesidad de un sistema revelador acoplado de la reacción antígeno-anticuerpo.

El principal inconveniente que presenta la fluorescencia es la interpretación subjetiva del observador, pero con personal entrenado en esta metodología, la subjetividad en la lectura de la intensidad de la fluorescencia no puede ser muy importante.

Lógicamente, como la finalidad de este trabajo era estudiar la utilidad de la serología en las infecciones causadas por *B. pertussis* y por la propia naturaleza de este trabajo no se iba a disponer de un número importante de especímenes reunidos, ni se podía demorar la ejecución de la prueba, se decidió la utilización de la inmunofluorescencia indirecta.

#### 5.6.7.2.- Tipos de substratos

El replanteamiento que actualmente se está efectuando sobre la patogenia de la enfermedad, la o las sustancias antigénicas necesarias para provocar una respuesta inmunológica protectora y la composición antigénica de las vacunas acelulares, dificulta la elección del substrato para estudiar las especificidades de los anticuerpos importantes. Parece ser que el aceptado y viejo concepto de que la tosferina es una enfermedad mediada, fundamentalmente, por la Toxina Pertussis o Factor Promotor de la Linfocitosis, etc. (9,135,264,295), está siendo cuestionado por otros autores (319,336,376).

No se discute el importante papel que la hemaglutinina filamentosa y la toxina pertussis tienen en la adhesividad de la bacteria a las células ciliadas del árbol respiratorio, pero estas dos sustancias no son las únicas que intervienen en la adhesividad, sino que los aglutinógenos y las proteínas exteriores de membrana (y de éstas sobre todo el pertactin), juegan un importante papel en este sentido. Más discutible es el papel de la toxina pertussis en la patogenia de la enfermedad. No existen dudas de que la pertussis es una enfermedad mediada por toxinas, ya que

la bacteria desaparece del huésped pero la sintomatología continúa durante un largo período de tiempo. Pero precisamente el síntoma más importante es la tos, por lo que de pensar en una toxina sería más coherente hablar de la citotoxina traqueal que de la toxina pertussis (336). Tampoco hay que olvidar el importante papel de la toxina adenilato ciclasa sobre la inhibición de la respuesta inmunológica.

De todo lo anteriormente expuesto, puede ser una idea más acertada utilizar la bacteria completa hasta que se clarifique el papel desempeñado por los distintos antígenos bacterianos. Además, se evitarán los problemas de purificación del antígeno utilizado como estándar y que, probablemente, es el causante de la incapacidad de transferencia de resultados entre los distintos estudios. Las preparaciones con bacterias completas proporcionan múltiples sitios antigénicos, pudiendo ser más sensibles que los antígenos purificados, siempre que se tenga la certeza de la ausencia de reacciones cruzadas con otras bacterias (120). La utilización de un antígeno purificado, con una mayor restricción de epitopos, no necesariamente ofrece ventajas sobre la utilización de la bacteria completa (114).

#### 5.6.7.3.- Respuesta del isotipo IgM a las infecciones causadas por *B. pertussis*

Un título de IgM superior al valor de referencia (1/40) casi siempre será diagnóstico de una infección reciente por *B. pertussis*, exceptuando el período de máxima respuesta a la vacuna. Con el calendario de inmunizaciones primarias recién finalizado, entre los ocho y doce meses de edad, se podría observar un título ligeramente superior al valor de referencia (1/80). Sin embargo, si este valor se

hallase en un lactante con el calendario de vacunas completas, difícilmente podría ser compatible con una infección, por lo que, en ausencia de otros marcadores serológicos o clínicos compatibles de pertussis, se atribuirá a las vacunas. Por otra parte, no se detectó ningún niño con evidencia serológica de pertussis en las edades comprendidas entre los siete meses y los dos años.

Su utilidad como marcador precoz de infección por *B. pertussis* está discutida. Mientras que algunos admiten su valor diagnóstico tanto en los sujetos vacunados como no vacunados (50,114,119,140,174,208,307,309,360), para otros, [fundamentalmente utilizan antígenos purificados como substrato, especialmente hemaglutinina filamentosa (174)] sólo tiene utilidad en los sujetos no vacunados, en los cuales se produce una respuesta primaria (120,168,209,210,218,308,365,377). Estas diferencias podrían explicarse porque la mayoría de estos estudios utilizan antígenos purificados, toxina pertussis o/y hemaglutinina filamentosa (174) y no suelen tener en cuenta el tiempo de evolución de la sintomatología. También habría que descartar una inhibición alostérica de la IgG sobre la IgM por una mayor afinidad y avidez de la IgG por el substrato.

La IgM se detectó en el 80% de los lactantes, no vacunados o con el calendario de vacunas no finalizado, con diagnóstico de pertussis frente al 48,8% de los niños vacunados. Esta diferencia podría ser atribuida a la ausencia de respuesta primaria en los sujetos vacunados, o a una respuesta de IgM rápida, de vida corta, que no se detectó por el retraso en el envío de los especímenes al laboratorio (174). Conway y col. (208) con un Elisa sobre bacterias completas, refieren que el 84% de

los seropositivos podrían haber sido detectados midiendo solamente la IgM. Resultados más parecidos a los encontrados en este estudio en sujetos vacunados han sido notificados por otros autores (50,114,119,174,218,360).

Se empezó a detectar a las 3 semanas del comienzo de la sintomatología en el 67% de los especímenes. Alcanzó su pico máximo entre el mes y los tres meses, con unos títulos máximos del 1/1280 y una seroprevalencia del 85%, perdiendo su valor diagnóstico a partir del quinto-sexto mes. Evoluciones similares de la IgM se han visto con Elis as sobre bacterias completas (174,360)

#### 5.6.7.4. Respuesta del isotipo IgA a las infecciones causadas por *B. pertussis*

La IgA es el isotipo más específico para el diagnóstico de las infecciones causadas por *B. pertussis* (25,28,50,143, 174,226,307,308,365,). Aunque es producida por un pequeño porcentaje de lactantes (19%) como respuesta a las distintas dosis de vacuna, su título raramente alcanza valores superiores al 1/40 en el período de máxima respuesta a la inmunización, entre los cuatro y cinco meses de la tercera dosis (218).

Su presencia por encima de los valores de referencia siempre va a ser un indicador fiable de infección por *B. pertussis*, aunque sólo se observó en el 40% de los lactantes y en el 26,8% de los niños vacunados. No todos los niños producen IgA en respuesta a las infecciones por *B. pertussis* (120). Robertson y col. (28) no han podido demostrar una prevalencia distinta dependiendo de la edad del paciente.

Granström y col. (210) no encuentran una respuesta distinta entre los niños mayores y menores de dos años. Sí observan una respuesta más intensa en los sujetos vacunados con respecto a los no vacunados. Sin embargo, Mertsola y col. (174) no pueden encontrar diferencias dependiendo del estado de vacunación del sujeto.

La prevalencia global de IgA en las infecciones por *B. pertussis*, varía ampliamente, entre el 7,7% de Granström y col. (212) midiendo IgA anti hemaglutinina filamentosa y el 73% de Lawrence y col (119) utilizando bacteria completa, pasando por el 23,3%, 27%, 29%, 42% y 62% de otras series (25,50,114, 212,360). Las posibles explicaciones para estas distintas prevalencias habría que buscarlas en el antígeno utilizado como sustrato, los establecimientos del cutoff, el tiempo de evolución de la infección cuando se extrajo la muestra, estado de vacunación del sujeto y edad del sujeto. Mientras todas estas variables no puedan ser unificadas, difícilmente se podrá hablar en el mismo lenguaje y hacer una transferibilidad de resultados.

La respuesta de IgA se empezó a detectar en el 38% de los especímenes a las 4-8 semanas del comienzo de la tos, alcanzando su prevalencia (50%) e intensidad máxima (1/640) entre los dos y tres meses de evolución, para casi desaparecer entre el quinto y sexto mes del comienzo de la infección (tablas 4.42 y 4.43). Mertsola y col., en Finlandia, con un enzimoimmunoensayo sobre bacterias completas, en una población con una tasa de vacunación y edades semejantes a la española, encontraron resultados parecidos a los referidos en este trabajo (174).

Por tanto, la IgA es un marcador de infección reciente muy específico pero relativamente sensible. Su prevalencia variará dependiendo de la muestra estudiada y sustrato utilizado, aunque no así su evolución con la enfermedad que tiende a tener un comportamiento parecido, independientemente del sustrato utilizado para su medición (50,140,212,174,307,308,377).

#### 5.6.7.5.- Respuesta del isotipo IgG a las infecciones causadas por *B. pertussis*

El isotipo IgG es el que presenta las mayores dificultades de interpretación debido a su frecuente presencia en el nacimiento, la importante respuesta a las distintas dosis de vacuna, infecciones subclínicas y a una vida media más larga que los otros isotipos. En la interpretación de sus concentraciones aisladas, sin los otros isotipos, será de suma importancia la edad del paciente para saber cuando finalizó el calendario de inmunizaciones y el tiempo de evolución de la tos.

Su presencia en el 100% de los lactantes como respuesta a las vacunas y en un gran porcentaje de sujetos como respuesta a las infecciones naturales subclínicas obliga a establecer cutoff diagnósticos elevados para poder considerar una posible infección. Aunque no hubo necesidad de dos muestras en los pacientes vacunados enviados para el estudio de pertussis, posiblemente éstas sean necesarias cuando existan discrepancias entre el comienzo de la sintomatología referido y la evolución serológica de la enfermedad y en ausencia de otros marcadores serológicos, IgM o/y IgA. Frecuentemente es difícil recoger de los padres con exactitud la fecha de comienzo de la tos, remontándose algunas veces a tiempos muy pretéritos y

refiriendo unas evoluciones cíclicas de la clínica con períodos de remisión. La IgG, al ser el único marcador encontrado en las infecciones con una evolución superior a los cinco o seis meses, podrá aportar alguna ayuda al respecto.

La IgG se encontró por encima del valor de referencia en el 90% de los lactantes y el 70,7% de los niños vacunados con diagnóstico serológico compatible de pertussis (119,172). Los incrementos de sus concentraciones se empezaron a observar entre las 3 y 5 semanas del comienzo de la sintomatología. Estudios en segmentos poblacionales no vacunados refieren un ligero retraso (1 semana) en la respuesta de la IgG, (210,309). Alcanzó su techo entre el primero y el octavo mes, habiéndose detectado por encima del valor de referencia más allá de los 24 meses de evolución de la enfermedad.

Cuando se estudia la utilidad diagnóstica de este isotipo comparándolo con una cohorte de referencia de la misma edad y aparentemente sanos, la eficacia diagnóstica de la IgG puede disminuir importantemente, a niveles del 10%, requiriendo un cambio significativo entre dos muestras para ser diagnóstico (40,50,114,174,360). Esto puede estar ocasionado por la frecuencia de infecciones subclínicas en el grupo de referencia seleccionado. En este isotipo, es más eficaz estudiar su comportamiento a lo largo de la vida de los individuos, para extraer los valores de referencia dependiendo de la edad del sujeto.



#### 5.6.8.- Estudio de anticuerpos contra la bacteria completa o contra antígenos específicos

Algunos autores prefieren estudiar por enzimo-inmunoensayos la respuesta de anticuerpos contra antígenos específicos, fundamentalmente la hemaglutinina filamentosa y la toxina pertussis. Sus razonamientos están basados en que estos dos antígenos son los principales factores patogénicos de la enfermedad.

Los anticuerpos dirigidos contra la hemaglutinina filamentosa jugarían un papel importante contra la infección al impedir la adhesión de las bacterias a las células ciliadas (200). Según Pittman (135), estos anticuerpos son de una duración más corta que los producidos en respuesta a la toxina pertussis, lo que explicaría porqué la inmunidad contra la infección es más corta que la inmunidad contra la enfermedad. Los anticuerpos dirigidos contra la toxina pertussis jugarían un importante papel contra la enfermedad al neutralizar la toxina pertussis (135). Su escasa producción en respuesta a las vacunaciones (63,140,218), le otorgaría el papel de marcador óptimo y exclusivo de infección por *B. pertussis*. (22,63,129,140,149,210-212,264,307,378-380). *B. parapertussis* no es productora de esta toxina aunque tenga el material genético para su codificación.

Sin embargo, algunos autores no han podido confirmar el papel que Pittman atribuyó a los anticuerpos dirigidos contra la Toxina pertussis. Farfel y col. (201) encontraron en su estudio sujetos con tosferina y títulos altos de anticuerpos dirigidos contra la toxina pertussis. Trollfors y col. (179) no pudieron correlacionar los títulos

de IgG anti-toxina pertussis y la actividad biológica de ésta medido por citotoxicidad sobre células de ovario de hamster. Hallander y col.(209) refieren un mayor valor a los anticuerpos dirigidos contra la hemaglutinina filamentosa por su permanencia sostenida en el tiempo, restándole valor a los anticuerpos anti-toxina pertussis en los sujetos vacunados, en donde la respuesta contra esta toxina se comportaría como una respuesta secundaria, tan rápida, que impediría observar un incremento del título de anticuerpos.

Objetivamente, este planteamiento sería muy lógico si no fuera porque se está a empezando a cuestionar el pensamiento de Pittman (9,135) sobre el papel estelar de la toxina pertussis en la patogenia de la enfermedad y sobre todo, su papel sobre el síntoma más predominante, la tos (336). No hay que olvidar la importancia que también tienen los aglutinógenos, fimbria y proteínas exteriores de membrana en la adhesividad de la bacteria a las células ciliadas, la adenilato ciclasa sobre la inhibición de la respuesta inmune (201) y la citotoxina traqueal sobre la destrucción de las células ciliadas, entre otras funciones.

Hasta ahora, el análisis de la respuesta inmunológica contra antígenos específicos puede estar justificado por:

- El estudio pormenorizado del papel que desempeñan cada antígeno en la enfermedad y su aplicación a la investigación de las respuestas humorales a los distintos tipos de vacunas acelulares.

- Menor imprecisión de la prueba por una mejor estandarización de los enzimoimmunoensayos al utilizar sustancias puras, teóricamente, en lugar de los múltiples antígenos de la bacteria completa, etc.

No obstante, hasta que se clarifique el papel patogenético de cada antígeno de *B. pertussis* (exceptuando el estudio de las vacunas acelulares), la utilización de la bacteria completa reproducirá más exactamente la interacción natural de la bacteria con el sujeto, pudiendo ser más recomendable para los estudios diagnósticos y epidemiológicos. Además, hasta el momento, no se ha podido asociar ningún título, ni especificidad de anticuerpo con la protección contra la enfermedad o la infección (140).

#### 5.6.9.- Algunas peculiaridades de la respuesta humoral

Por último, comentar algunos casos en donde la respuesta inmunológica manifestó algunas peculiaridades dignas de ser mencionadas.

Una de las peculiaridades fue la ausencia de una respuesta humoral a las tres dosis de vacuna observada en dos lactantes de tres meses con diagnóstico clínico y serológico de tosferina e importantes títulos de anticuerpos (IgM superior a 1/80 e IgG superior a 1/320) en el momento de comenzar el calendario de vacunas. Al finalizar las inmunizaciones, siete meses de edad, estos lactantes presentaban el mismo título de IgG, y la IgM prácticamente se había negativizado. Posiblemente, estos anticuerpos neutralizaron los antígenos suministrados con las dosis de vacuna,

abortando el estímulo antigénico, por un mecanismo similar al ejercido por las concentraciones altas de los anticuerpos maternos en las vacunaciones de los lactantes (278-280).

En otro caso, no se observó la respuesta humoral en una niña de siete años con tos de cuatro días de evolución, cultivo positivo para *B. pertussis* e iniciación del tratamiento con eritromicina inmediatamente después de la toma de especímenes. No se detectaron ningún tipo de anticuerpos en el momento de la consulta, ni a los cuarenta días de evolución de la enfermedad. Aparte de la pertussis, la niña era totalmente sana. Existen múltiples referencias, no todas en el mismo sentido, sobre la utilidad de la eritromicina en la erradicación de *B. pertussis* del árbol respiratorio (21,69,121-125,127,382) o su fracaso (383,384); la modificación (11,25,39,50,66,124,125,127,354,359) o no (11,32,40,46,66,128,284,295,385-388) del curso de la enfermedad; la recomendación de su utilidad (11,21,23,26,39,47,69,124,211,218,293), o inutilidad (37,39,40,128,209,277,383-386) en la profilaxis de los contactos, pero únicamente se encontraron dos trabajos de Granström y col. en donde se recogiera la inhibición de la respuesta humoral por la eritromicina. Los casos no son totalmente superponibles por cuanto se trata de tres embarazadas, en donde la inmunidad puede estar inhibida per se por su propia situación gestacional. Tienen en común el tratamiento precoz con eritromicina, entre cuatro y seis días del comienzo de la enfermedad (200,212).

Un tercer caso corresponde a un niño de 9 años, que a los dos años de una pertussis tratada con múltiples antibióticos y con un título de IgG de 1/320, volvió a

tener tos persistente y un fuerte incremento de todos los isotipos ( $IgM = 1/80$ ,  $IgA = 1/320$  e  $IgG = 1/2560$ ). No se le realizó cultivo y se le trató inmediatamente con eritromicina durante catorce días. Este caso documenta la temporalidad de la inmunidad desarrollada como consecuencia de la infección natural. La corta inmunidad que desarrolló este niño a la infección natural previa correspondería más a la evocada por la vacuna, en lo referente al menos, a su duración, que a una inmunidad derivada de una infección natural, que aunque no dure de por vida, si debería haber sido más larga. Quizá entre cinco y diez años, según se puede inferir de las prevalencias de diagnóstico serológico compatible de tosferina en la cohorte control. En esta cohorte, como se recordará, se produce un incremento de diagnóstico serológico de pertussis desde los tres años de edad hasta los diez años, como consecuencia de infecciones por *B. pertussis*. Posteriormente hay un descenso serodiagnóstico, entre los 10 y los quince años (posiblemente por ser un grupo con una buena inmunidad emanada de infecciones naturales previas) para sufrir un fuerte incremento serológico a partir de los quince años, por el debilitamiento de la inmunidad aportada por la infección (15,27,31,32,48,66,73,169,260).

#### 5.6.10.- Anticuerpos anti-*B. pertussis* en las secreciones respiratorias

La determinación de anticuerpos anti-*B. pertussis* en especímenes del árbol respiratorio fue otra de las alternativas esperanzadoras desarrollada por Goodman y col en 1981 (115) en respuesta a las dificultades inherentes al aislamiento del microorganismo, su detección en las secreciones nasofaríngeas mediante la

fluorescencia directa y a la falta de sensibilidad y demora intrínseca para el diagnóstico de los métodos serológicos clásicos (115,120,389). Sin embargo, las esperanzas generadas por la originalidad de la idea parecen no haber aportado el rendimiento esperado.

Se detectaron anticuerpos anti-*B. pertussis* en el 24,7% de las 162 salivas de los sujetos remitidos para el estudio de pertussis. De estos 40 resultados positivos, 23 pertenecieron a sujetos con criterio serológico o bacteriológico de tosferina (45% de los positivos) y los 17 restantes correspondieron a los serológicamente negativos (15,3%). Los anticuerpos encontrados fueron de los isotipos IgG e IgA no guardando ninguna relación con sus homónimos séricos (218). Su utilidad diagnóstica parece residir más en su capacidad excluyente de infección (especificidad del 85% y valor predictivo negativo del 77%) que en su confirmación, máxime si tenemos en cuenta que se sintetizan exclusivamente en respuesta a la infección (no a las inmunizaciones) (115,207). Goodman y col. (115) encontraron IgA contra *B. pertussis* en el 13,8% de las 348 secreciones estudiadas. De los 57 cultivos positivos, sólo se detectó IgA secretora en 8 sujetos (14%), y en 40 sujetos con cultivos negativos (13,7%). Campbell y col. (207) detectaron IgA en las secreciones del 24% de las pertussis y en el 9% de los controles, con unos resultados dudosos en el 28% de las pertussis y en el 40% de los controles. Atribuyen estos resultados dudosos a una posible adsorción o unión inespecífica de la IgA secretora a *B. pertussis*. Zackrisson y col. (390) vieron en un tercio y un cuarto de las 181 salivas estudiadas cambios significativos en la IgA anti hemaglutinina filamentosa y toxina pertussis, respectivamente. No comparte la utilidad diagnóstica de la IgA secretora señalada

por Granström y col.(391), atribuyéndole un poder diagnóstico inferior a la determinación sérica de anticuerpos anti-*B. pertussis*. Resultados más alentadores han sido comunicados por Friedman (118) mediante inmunodot con anticuerpos monoclonales, refiriendo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 88%.

Los anticuerpos secretores se empezaron a detectar a partir del mes del comienzo de la enfermedad, detectándose la IgA más allá de los tres meses del comienzo y la IgG más allá de los cinco meses (115,207).

Long y col. (218) y Savage y col. (279) encontraron los anticuerpos secretores más frecuentemente en las personas infectadas asintomáticas que en aquellos con síntomas.

#### 5.7.- Estimación de los posibles casos de tosferina en el Area Sanitaria 10.

Ya que los casos remitidos para el estudio de tosferina pertenecen a la población de donde se extrajo la cohorte de control, se pueden hacer unas estimaciones de los casos de tosferina del Area Sanitaria 10, a partir de la prevalencia de serodiagnóstico de tosferina en la muestra control y de la prevalencia de casos de tosferina remitidos para su estudio. Ambos grupos, cohorte control y cohorte de estudio, presentan unas situaciones similares socio/sanitarias. Lo único que les diferencia, y que les hace pertenecer a uno u otro grupo, es la demanda de asistencia sanitaria o que su médico se haya planteado la sospecha de pertussis en el diagnóstico diferencial. La población menor de 15 años del Area Sanitaria 10 está

integrada por 63.800 sujetos (231). Las prevalencias extremas de tosferina en estos sujetos, estimadas a partir de la cohorte control de la misma edad de este estudio, están entre un 5,8% y el 15,2% (I.C. 95%; Poder contraste 93,6%), lo que supone entre 3700 y 9.698 casos.

La demanda de estudios de pertussis durante los cuatro años que duró la recogida de muestra fue de 162 sujetos. De ellos, 151 menores de 15 años. Los casos compatibles con pertussis por el laboratorio fueron 51, todos ellos se observaron en menores de 15 años. Así pues, se detectaron 51 casos positivos sobre 151 menores de quince años estudiados, lo que representa un porcentaje del 33,8%. Teniendo en cuenta que este segmento poblacional está formado por 63.800 personas, la incidencia anual estimada de tosferina en los menores de quince años será de 5.387 casos. Así pues, ambas estimaciones (serodiagnóstica y seroepidemiológica) son coincidentes, como era de esperar de un método serológico capaz de discriminar la población sana de la enferma con los cutoff seleccionados.

Entre 1988 y 1991 (último período de cuatro años con datos oficiales disponibles) se declararon en el Area Sanitaria 10 de Madrid 246 casos de tosferina (368,369). Estos 246 casos (se asume que estos casos notificados correspondieron a niños menores de quince años) representan una declaración del 2,5% al 6,6% sobre el total de los 3.700-9.698 posibles casos de tosferina estimados en el Area Sanitaria 10. Por tanto, no parece existir duda de que los casos de tosferina en este Area Sanitaria se están infranotificando (36,38,51,62,70, 76,84,87,228,229).



Los 51 sujetos con diagnóstico clínico de presunción confirmados por el laboratorio representan entre el 0,53% y el 1,4% de la demanda potencial (3.700-9.698). Esto da una idea de la enorme dificultad que existe para hacer un diagnóstico de sospecha de tosferina. Asimismo, parece que los pediatras e internistas no se plantean la pertussis en el diagnóstico diferencial de los niños vacunados con tos persistente (22,26,30,37). Posiblemente, ésto ocurre por tener la creencia que la vacuna y, sobre todo, la infección natural aportan una inmunidad que dura toda la vida del individuo (3,27,71,127).

#### 5.8.- Respuesta a las preguntas iniciales

¿Es la tosferina una enfermedad obsoleta?. ¿Existen las infecciones por *B. pertussis* en sujetos vacunados?. ¿Se conoce su incidencia?. ¿Por qué pasan inadvertidas?. ¿Qué dificultades diagnósticas presentan?. ¿Cómo se pueden diagnosticar?. ¿Hay alternativas al diagnóstico bacteriológico y clínico?.

Después de todo lo anteriormente expuesto, creemos poder contestar a las preguntas iniciales con suficiente rigor. La pertussis es una enfermedad con gran vigencia en la actualidad, infranotificada por la clínica, frecuentemente atípica en lactantes pequeños y sujetos vacunados. La enorme dificultad que existe para hacer un diagnóstico clínico certero, se debe a que los facultativos, en general, la consideran desaparecida en los sujetos vacunados y su diagnóstico bacteriológico presenta una casi nula sensibilidad en la fase paroxística, máxime en los sujetos

vacunados. Hasta el momento presente, la enfermedad se puede diagnosticar midiendo la respuesta del huésped al agresor, tanto a la infección subclínica como a la clínica. La serología, hoy por hoy, aparece como la gran alternativa al diagnóstico bacteriológico, no excluyente sino complementaria del mismo.

Por último, hay que volver a insistir en la importante vulnerabilidad de los neonatos y lactantes pequeños. La sintomatología tan atípica que pueden presentar estos sujetos puede inducir a crear la falsa idea de una escasa mortalidad y morbilidad de la enfermedad en ellos, cuando en realidad lo que está ocurriendo es un diagnóstico insuficiente. Se estima que sólo una de cada diez muertes ocasionadas por la pertussis es atribuida a esta enfermedad (392,393). Esto habrá que tenerlo en cuenta antes de introducir alteraciones en los calendarios de inmunizaciones que puedan producir modificaciones epidemiológicas.

## **6.- RESUMEN**

La tosferina, tos ferina, pertussis, coqueluche, tos de los cien días es una enfermedad mediada por las toxinas elaboradas por *B. pertussis* y caracterizada por una traqueobronquitis aguda que afecta únicamente al género humano. Las manifestaciones clínicas, que dieron nombres a la enfermedad, consisten en ataques de tos paroxística seguidos de un típico estridor inspiratorio y/o vómitos.

La amplia utilización de la vacuna desde finales de la década de los cuarenta en los países desarrollados y las presentaciones clínicas atípicas de la enfermedad en lactantes pequeños, vacunados, adolescentes y adultos han inducido a algunos facultativos a considerarla como una curiosidad médica o a afirmar que nadie se infecta después de los doce o quince años de edad.

A partir de la década de los ochenta se viene observando un aumento gradual de la incidencia de esta enfermedad en los países desarrollados, siendo los niños mayores, adolescentes y adultos una fuente importante de contagio. Pudiera tratarse de que, o bien después del calendario de inmunizaciones, o bien después de padecer una pertussis, los individuos produjeran una inmunidad contra la enfermedad pero no contra la infección. Ello no impediría que, pasado un cierto período de años, estos individuos se volvieran susceptibles a una nueva reinfección con una de las bacterias más contagiosa, sensible y delicada conocida hasta la actualidad, *Bordetella pertussis*.

El problema del diagnóstico de la pertussis reside en su posible y frecuente presentación clínica atípica (la mayoría de las veces indistinguible de otros procesos

infecciosos de las vías respiratorias) y en la enorme dificultad para el aislamiento de esta bacteria, agudizada en sujetos vacunados. Esto ha motivado un editorial del CDC, en 1985, en donde se pone de manifiesto que la metodología corrientemente utilizada para el diagnóstico de pertussis parece inadecuada.

La verdadera incidencia de la pertussis es desconocida, tanto en los países en vías de desarrollo, como en los países desarrollados. Tal desconocimiento es consecuencia de múltiples factores que inciden sobre la practicabilidad del control epidemiológico de la enfermedad, como: la sintomatología atípica, ausencia de métodos diagnósticos sensibles y específicos, aceptación del criterio clínico para la inclusión del caso pertussis en los sistemas de vigilancia epidemiológicos, la insensibilidad e inespecificidad de los síntomas, etc. La ausencia de una metodología apropiada para el diagnóstico correcto de la enfermedad, teniendo el clínico que efectuar su diagnóstico por la sintomatología que presenta el paciente, hace extraordinariamente complejo el emitir un juicio diagnóstico certero.

El aislamiento del microorganismo es el método de referencia para el diagnóstico de cualquier enfermedad infecciosa. Mientras que el cultivo positivo de *B. pertussis* es una herramienta diagnóstica totalmente específica para la pertussis, su sensibilidad puede ser extraordinariamente baja, dependiendo de múltiples factores: retraso en la toma del espécimen, recogida inadecuada del mismo, manipulación de la muestra inapropiado, crecimiento de otras bacterias u hongos, falta de reconocimiento de la bacteria, sujetos vacunados, terapia antibiótica previa, etc.

La identificación directa de *B. pertussis* en los especímenes nasofaríngeos mediante fluorescencia directa fue una alternativa diagnóstica que surgió en la década de los sesenta como respuesta a la dificultad del aislamiento, a los tiempos largos de incubación necesarios para el crecimiento de la bacteria (3-7 días) y a la no necesidad de bacterias viables para su realización. Su calidad analítica (sensibilidad y especificidad) resta mucho de ser la adecuada por lo que desde 1990 no es aceptada por el CDC para la admisión del caso de pertussis en los sistemas de vigilancia epidemiológica.

La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) es una alternativa diagnóstica emergente en fase de desarrollo..

Así pues, la dificultad del diagnóstico clínico (que ocasionará un importante retraso en la sospecha del diagnóstico y la petición de confirmación por el laboratorio), junto con la pobre calidad analítica de los métodos bacteriológicos han originado, en los últimos años, el desarrollo y estudio de métodos que midan la respuesta del huésped contra el agresor: los anticuerpos. Estos tienen la gran ventaja de aportar información correspondiente tanto a las infecciones clínicas, como a las subclínicas.

El diagnóstico serológico tiene en la sensibilidad su mayor ventaja sobre el diagnóstico bacteriológico, aunque, lógicamente, su especificidad no puede ser superior. Los nuevos métodos serológicos, que permiten descomponer la respuesta inmunológica humoral, facilitan el estudio de la secuencia y evolución de los distintos

isotipos de anticuerpos y aportan una mayor sensibilidad y rapidez diagnóstica a las pruebas serológicas.

Los enzimoimmunoensayos e inmunofluorescencia indirecta son metodologías con una calidad analítica muy similar. La elección de uno u otro método dependerá de la finalidad de su utilización. Los enzimoimmunoensayos, al ser fácilmente automatizables, permiten procesar un gran número de muestras en un corto período de tiempo. La inmunofluorescencia indirecta es la metodología ideal para la utilización con una finalidad diagnóstica, no precisando un número determinado de especímenes para obtener una ejecución rentable. El empleo de la bacteria completa como substrato reproduce más fielmente las condiciones naturales de la reacción huésped/invasor.

Una de las dificultades que existe en la interpretación de una prueba de laboratorio, reside en definir una referencia óptima con la que poder efectuar la comparación de los resultados. En el diagnóstico serológico de pertussis, la primera dificultad reside en tener la certeza, o al menos el conocimiento, de no estar incluyendo sujetos con infecciones subclínicas en la cohorte de referencia. Un conocimiento de esta situación, lo más aproximado posible, sólo se puede alcanzar estudiando la evolución de los anticuerpos dirigidos contra *B. pertussis* a lo largo de la vida de los individuos. Es por ésto, por lo que se estudiaron las prevalencias y concentraciones de anticuerpos en un amplio número de sujetos (2.589) del Area Sanitaria 10 de Madrid, de donde procedieron las demandas del estudio de pertussis por el laboratorio.

En éste Area Sanitaria, el 83,9% de los recién nacidos, nacieron con anticuerpos IgG dirigidos contra *B. pertussis* y con unos títulos superiores (media del 31,7%) a las concentraciones de anticuerpos de sus madres. Estos anticuerpos experimentaron un rápido catabolismo, dando lugar a un descenso acusado de la seroprevalencia y concentración en los neonatos. La seroprevalencia fue del 66% y la concentración media representó el 13,5% de la concentración media al nacimiento. Las concentraciones de anticuerpos entre el momento del nacimiento y el comienzo de las vacunaciones (tres meses) van a estar definidas por una ecuación de regresión recíproca.

El poder protector que estos anticuerpos maternos ejercen sobre los neonatos y lactantes sólo puede basarse en la observación clínica, puesto que no ha podido relacionarse un título de anticuerpos con la protección contra la infección. En la muestra remitida con diagnóstico de presunción de pertussis no se pudo confirmar ningún caso en los neonatos. Los primeros casos de tosferina se empezaron a detectar a partir del mes de edad.

En el momento previo al comienzo del calendario de inmunizaciones se observaron anticuerpos en el 19,8% (I.C.95%: 14,5%-25,1%) de los lactantes, a unos títulos iguales o inferiores a la dilución 1/40. Sería muy interesante estudiar en estos lactantes seropositivos su respuesta a las distintas dosis de vacuna y sus posibles implicaciones en una pobre respuesta de anticuerpos a la vacuna.



Las respuestas de anticuerpos a las distintas dosis de vacuna se empezaron a manifestar tímidamente al mes de la primera inoculación en los isotipos IgG e IgM. La respuesta del isotipo IgA no se vio hasta los dos meses del estímulo antigénico. Una respuesta importante de anticuerpos no se evidenció hasta la administración de la segunda dosis de vacuna, siendo esta respuesta, fundamentalmente, del isotipo IgG. Los anticuerpos producidos como respuesta a las distintas dosis de vacuna van a seguir aumentando hasta el tercero o quinto mes de haber finalizado el calendario de inmunizaciones primarias contra la pertussis. La ecuación que mejor define el incremento de anticuerpos IgG en respuesta a las vacunas es una ecuación de regresión lineal entre los cuatro y los doce meses. Las seroprevalencias máximas se observaron en los lactantes con edades comprendidas entre los diez y los doce meses. En el isotipo IgG la seroprevalencia fue del 90,4% (I.C.95%: 85,5-95,3%), aunque en un 26,7% de lactantes (I.C.95%: 19,1-34,3%) los títulos alcanzados fueron iguales o inferiores al 1/40. Los otros dos isotipos, IgA e IgM, se detectaron en el 27,9% (I.C.,95%: 20,4-35,4%) y el 52,9% (I.C.95%: 44,6-61,2%) de los lactantes, respectivamente. El título máximo que se alcanzó fue del 1/40 para la IgA y del 1/80 para la IgM. Esta pobre respuesta de los isotipos al calendario de inmunizaciones será de gran ayuda diagnóstica ante la sospecha clínica de una tosferina. En este último supuesto, la respuesta de estos isotipos será marcada en un número importante de pacientes.

A partir de los cinco o seis meses de finalizado el calendario de vacunaciones se va producir un descenso importante de los anticuerpos, descenso que remeda el catabolismo de los anticuerpos maternos en los lactantes. Tal catabolismo,

también, viene definido por una ecuación de regresión recíproca, con un descenso muy pronunciado hasta los dieciocho meses de edad y una posterior disminución suave y progresiva hasta los 10-15 años.

No se pudo confirmar por el laboratorio ningún caso con sospecha de pertussis hasta pasados 29 meses de la finalización del calendario de vacunas. A partir de los tres años de edad, se comenzaron a confirmar por el laboratorio sujetos remitidos con sospecha clínica de pertussis. Los distintos grupos, en que fueron divididos los niños hasta los 15 años, presentaron una prevalencia media de serodiagnóstico de pertussis que osciló entre un 8% y un 25%. La menor prevalencia serológica de pertussis se observó entre los diez y los quince años para producirse, posteriormente, un fuerte incremento en los mayores de quince años (adolescentes, adultos y tercera edad).

Aproximadamente, el 20% de los sujetos mayores de quince años de la muestra control presentaron una serología compatible de pertussis. Esto lleva a plantearse el papel desempeñado por los adolescentes y adultos como reservorio, y en la propagación y mantenimiento de las infecciones por *B. pertussis*. También, sería interesante estudiar la duración de la inmunidad producida después de una infección natural. Hasta hace pocos años se decía que la inmunidad conferida por la infección natural duraba toda o casi toda la vida. Con los resultados obtenidos en este grupo de edad (adolescentes y adultos), con el descenso de serodiagnósticos de pertussis entre los diez y los quince años y con un caso de tosferina reinfectado a los 24 meses del comienzo de la enfermedad, parece que la inmunidad humoral

producida por la infección natural, aunque de mayor duración que la evocada por las vacunas, puede empezar a desvanecerse en un período relativamente corto de tiempo.

Como consecuencia del papel tan importante atribuido a los adolescentes y adultos en la perpetuación y transmisión de la infección, numerosos médicos recomiendan el uso periódico de vacunas en estos segmentos de edad cuando se demuestre la existencia de una vacuna acelular segura y eficaz. El problema reside en el escaso conocimiento de la patogenia de la enfermedad y del papel que la respuesta inmunológica juega contra los distintos componentes de la bacteria para prevenir el anidamiento, colonización, producción de sustancias tóxicas y la enfermedad. Hasta la actualidad no se ha podido establecer una correlación entre el título de un anticuerpo específico contra alguno de los componentes bacterianos y la protección contra la enfermedad natural.

De los 162 sujetos remitidos con la sospecha clínica de pertussis, en 51 (31,5%) se pudo demostrar por el laboratorio un diagnóstico compatible con la tosferina, en la mayoría de los casos por la serología. Este porcentaje no difiere del encontrado en otros países con índices bajos de vacunación, en donde los casos con sospecha clínica de tosferina presentaron una clínica no modificada por la vacunación. De estos 51 sujetos, todos eran menores de quince años, 25 fueron niñas y 26 niños.

La distribución de las peticiones por grupos de edades fueron las siguientes: el 29,6% de las peticiones se hicieron a niños entre los cinco y los diez años; el 28,5% se realizaron en lactantes menores de seis meses; un 16,7% correspondieron a los 3-5 años; 12,3% entre los 10-15 años. El resto de las peticiones se distribuyeron en otras edades. Esta demanda coincide con los picos de incidencia de la tosferina esperados en un país con altas tasas de vacunaciones, como el nuestro. La mayor demanda se efectuó en el primer semestre del año (74,7%). El 47% de los casos positivos se produjeron entre los meses de Enero a Marzo, ambos inclusive.

El mayor porcentaje de confirmaciones por el laboratorio del diagnóstico de sospecha de pertussis se obtuvo en los pacientes con edades comprendidas entre los 5 y los 15 años, en donde se pudo confirmar el 50% de los casos remitidos con diagnóstico de presunción de pertussis. Parece ser que a estas edades los pediatras van a tener menos dificultades para establecer un diagnóstico diferencial. No se puede decir lo mismo de los lactantes menores de seis meses, ni de los niños con edades comprendidas entre los 3 y los 5 años. La sospecha clínica de pertussis pudo ser confirmada en el 20-25% de los casos demandados.

No se pudo encontrar en la sintomatología una ayuda diagnóstica. La duración y características de la tos no aportaron ningún valor diagnóstico. No fue posible demostrar una diferencia en la duración de la tos entre los sujetos con diagnóstico positivo por el laboratorio y los que fueron negativos. En ambos grupos, el tiempo transcurrido desde el comienzo de la tos hasta la solicitud del estudio fue excesivo, 85,7 días en los casos afirmativos frente a los 109 días de los casos

negativos. En los lactantes estos tiempos estuvieron muy acortados. Los casos afirmativos tuvieron una duración media de la tos de 15,2 días. En los casos negativos este tiempo fue más corto, 12,05 días. Aunque las características de la tos no parecen aportar una ayuda diagnóstica, una tos persistente, que empeora por la noche, o después del ejercicio o de la exposición a bajas temperaturas, debería levantar la sospecha de pertussis.

Los vómitos inducidos por la tos tampoco pudieron demostrar una utilidad diagnóstica. Estuvieron presentes en el 37,2% de los casos afirmativos frente al 43,2% de los negativos. Este síntoma era referido en la mayoría de los lactantes y en la encuesta realizada a los padres era difícil precisar hasta que punto era un vómito provocado por la tos o una pequeña regurgitación posterior a la toma del biberón.

En ninguno de los casos de pertussis confirmada por el laboratorio se pudo observar una temperatura corporal superior a los 37,5°C.

De los estudios hematológicos, la linfocitosis y eosinofilia presentaron un valor diagnóstico positivo y negativo respectivamente, estadísticamente significativo. Los sujetos con serología o cultivo positivo tuvieron una cifra media de linfocitos de 10.310/mm<sup>3</sup> frente a los 8.006/mm<sup>3</sup> de los negativos ( $t = 3,02$ ). Mayor diferencia estadística ( $t = 5,3$ ) se observó en los eosinófilos. La presencia de una cifra de eosinófilos superior a 330/mm<sup>3</sup> induce a excluir el diagnóstico de tosferina.

No se detectó ninguna hipoglucemia en los casos estudiados.

*B. pertussis* se aisló en cuatro sujetos, lo que representó el 2,5% de los sujetos estudiados. Sobre los 51 sujetos con confirmación de pertussis por el laboratorio, estos cuatro cultivos positivos representó el 7,7%. De los cuatro cultivos positivos, dos correspondieron a lactantes, de tres y cuatro meses, y con una evolución de la enfermedad de 7 y 20 días, respectivamente. Los otros dos cultivos positivos pertenecieron a dos niñas de 7 y 10 años, vacunadas. Ambas tenían en común el no estar tomando antibióticos y una evolución de la tos de 4 y 7 días, es decir, estaban en la fase catarral de la enfermedad. Cuarenta y cinco niños sobre los 51 con pertussis confirmada por el laboratorio estaban tomando antibióticos en el período previo a la solicitud del estudio, la mayoría de ellos amoxicilina.

La fluorescencia directa sobre especímenes nasofaríngeos sólo aportó un resultado positivo dudoso sobre los 162 sujetos del estudio.

Excepto en el 30% de los lactantes, en el resto de los individuos fue suficiente un único suero para realizar el diagnóstico serológico de pertussis. Un título de IgM superior a la dilución 1/40 casi siempre será diagnóstico de una infección reciente. Se detectó por encima de la dilución 1/40 en el 80% de los lactantes no vacunados y en el 48,8% de los niños vacunados con diagnóstico compatible de pertussis. Se empezó a observar a las tres semanas del comienzo de la sintomatología, alcanzó su pico máximo entre el mes y los tres meses, perdiendo su valor diagnóstico a partir del quinto/sexta mes.

La IgA es el isotipo más específico para el diagnóstico de las infecciones causadas por *B. pertussis*. Aunque es producido por un pequeño porcentaje de lactantes, 19,2%, como respuesta a las distintas dosis de vacuna, su título raramente alcanzó valores del 1/40 en el período de máxima respuesta a las inmunizaciones. Su presencia por encima del rango de referencia siempre va a ser un indicador fiable de infección por *B. pertussis*, aunque sólo se observó en el 40% de los lactantes y en el 25,5% de los niños vacunados. Se empezó a detectar a partir de las 4-8 semanas del comienzo de la tos, alcanzando su concentración máxima entre los dos y los tres meses de evolución, para casi desaparecer entre el quinto y el sexto mes del comienzo de la infección.

El isotipo IgG es el que tuvo las mayores dificultades de interpretación debido a su frecuente presencia en los recién nacidos, la importante respuesta a las distintas dosis de vacunas y a las infecciones subclínicas, y a su vida media más larga que los otros isotipos. Se halló por encima del rango de referencia en el 90% de los lactantes y el 72,5% de los niños vacunados, con diagnóstico serológico compatible de pertussis. Los incrementos de sus concentraciones se empezaron a observar entre las 3 y las 5 semanas del comienzo de la sintomatología. Su techo se mantuvo entre los dos y los ocho meses, habiéndose detectado por encima del rango de referencia más allá de los 24 meses de evolución de la enfermedad.

Por último señalar, que se detectaron anticuerpos dirigidos contra *B. pertussis* en el 24,7% de las 162 salivas de los sujetos remitidos para el estudio de pertussis. De estos 40 resultados positivos, 23 (45%) pertenecieron a sujetos con criterio

serológico o bacteriológico de tosferina y los 17 (15,3%) restantes correspondieron a los serológicamente negativos. Los anticuerpos encontrados fueron de los isotipos IgA e IgG, no guardando ninguna relación con sus homónimos séricos. Su utilidad diagnóstica parece residir más en su capacidad excluyente de infección (especificidad del 85% y valor predictivo negativo del 77%) que en su confirmación, máxime si se tiene en cuenta que se sintetiza exclusivamente en respuesta a la infección. Los anticuerpos secretores se empezaron a ver a partir del mes del comienzo de la sintomatología, detectándose la IgA más allá de los tres meses del comienzo y la IgG más allá de los cinco meses.



## **7.- CONCLUSIONES**

**1ª. La pertussis es una enfermedad endémica**

Las infecciones causadas por *B. pertussis* presentan una amplia distribución entre la población general, incluso entre los sujetos vacunados, como se puede inferir de la alta seroprevalencia (50-70%) y del importante porcentaje de serodiagnósticos compatibles de pertussis (6-20%), en la muestra de referencia estudiada..

**2ª. Los recién nacidos presentan anticuerpos dirigidos contra *B. pertussis***

El 84% de los recién nacidos en el Area Sanitaria 10 presentaron anticuerpos al nacer a unas concentraciones ligeramente superiores a las maternas. La protección conferida por estos anticuerpos parece no durar más allá de un mes.

**3ª. Las infecciones por *B. pertussis* producen una sintomatología atípica que difícilmente se distingue de otras infecciones de las vías respiratorias**

En un tercio (51/162), aproximadamente, de los casos remitidos para el estudio de pertussis se pudo confirmar el diagnóstico.

**4ª. Se produce una excesiva especulación del diagnóstico de pertussis en los lactantes menores de seis meses**

El diagnóstico de pertussis pudo ser confirmado por el laboratorio en el 20% de los estudios solicitados. El tiempo medio transcurrido entre el comienzo de la sintomatología y la demanda del estudio osciló entre los 12 y los 15 días

### **5ª. Los pediatras e internistas no piensan en la pertussis en los sujetos vacunados**

Esto origina una excesiva demora en la solicitud del estudio del laboratorio, entre 86 y 109 días.

### **6ª. La tosferina es escasamente diagnosticada**

Los casos de pertussis confirmados por el laboratorio representaron menos del 1,5% de los casos potenciales estimados.

### **7ª. Necesidad del diagnóstico de los casos atípicos**

Es muy deseable diagnosticar los casos atípicos de pertussis ya que estos casos parecen ser el reservorio principal para la transmisión de la enfermedad a los neonatos y lactantes.

### **8ª. El aislamiento de la *B. pertussis* presenta importantes dificultades**

*B. pertussis* se aisló en el 20% de los lactantes no vacunados y en el 4,8% de los sujetos vacunados. Esta dificultad en el aislamiento de la bacteria radica en la naturaleza patofisiológica de la infección. Los síntomas y signos sugerentes de pertussis, cuando se producen, no ocurren hasta pasado tres o cuatro semanas del comienzo de la enfermedad, en la fase de tos paroxística o persistente. Por el contrario, el aislamiento de la bacteria es más factible en la fase catarral de la enfermedad.

**9ª. Excesiva utilización de los antibióticos**

El uso de antibióticos previo a la toma del espécimen nasofaríngeo añade dificultad al aislamiento de la bacteria. El 88% de los sujetos remitidos para estudio estaban tomando antibióticos cuando acudieron al laboratorio. En el 50% de los sujetos, el antibiótico empleado fue la amoxicilina, lo que parece señalar la gran aceptación social de este antibiótico.

**10ª. La tosferina es infranotificada al sistema de vigilancia epidemiológica**

Las estimaciones realizadas en el Area Sanitaria 10 de Madrid ofrecen unos porcentajes de declaraciones de pertussis que oscilan entre el 2,5% y el 6,6% de los casos estimados.

**11ª. La tosferina precisa de nuevas estrategias diagnósticas**

Es imposible que una sólo prueba diagnóstica pueda ser lo bastante sensible y específica para detectar las infecciones por *B. pertussis* en todas las fases de la enfermedad.

**12ª. La serología complementaria del cultivo para el diagnóstico de la tosferina**

Solamente los estudios serológicos pueden proporcionar la información sobre la prevalencia de las infecciones por *B. pertussis*. Sus datos son cruciales para obtener un conocimiento lo más exacto posible de la epidemiología, incidencia de pertussis y eficacia de las vacunas. La pertussis continúa siendo una

infección esquiva en términos de inmunidad, diagnóstico y control a través de las vacunaciones.

### **13ª. Los isotipos IgA e IgM son los que aportan mayor especificidad diagnóstica**

La escasa producción en respuesta a las vacunas de los isotipos IgA (19%) e IgM (30%) les hace sumamente útiles para el diagnóstico de pertussis.

### **14ª. Los anticuerpos secretorios tienen un valor diagnóstico excluyente**

Su utilidad diagnóstica parece residir más en su capacidad excluyente de infección (especificidad del 85% y valor predictivo negativo del 77%) que en la confirmación de la misma.

### **15ª. Las vacunaciones actuales proporcionan una inmunidad transitoria contra la infección**

La inmunidad conferida por el calendario actual no parece proporcionar una eficacia del 100% más allá de los 30 meses de edad. A partir de los tres años de edad empiezan a aparecer casos con serodiagnóstico compatible con una pertussis.

### **16ª. Eficacia de la vacuna**

En la valoración de la eficacia de un calendario de inmunizaciones hay que tener clara la finalidad del mismo. Es importante saber si se va a dedicar al control o a la erradicación de la enfermedad. Si la meta es reducir la

mortalidad/morbilidad de la enfermedad, una vacuna será eficaz si previene la enfermedad. Si lo que se pretende es evitar o cortar la transmisión y, en última instancia, la erradicación de la enfermedad, la eficacia de las vacunas debe medirse en términos de protección contra la infección.

#### **17ª. Erradicación de la tosferina con vacunaciones periódicas**

La erradicación de la pertussis puede ser un objetivo ilusorio con las actuales vacunas. Posiblemente, lo único que se pueda conseguir son cambios en las edades de incidencia de la infección, dependiendo de los calendarios de inmunizaciones.

#### **18ª. Precauciones con las modificaciones epidemiológicas provocadas por las inmunizaciones**

Mientras tanto, antes de provocar cambios epidemiológicos por la manipulación de las inmunizaciones, hay que tener muy presente que el segmento poblacional más vulnerable está constituido por neonatos y lactantes. No se nos convierta la excesiva intervención humana en una "bomba de relojería", dejando desprotegido a este segmento de la población.

#### **19ª. Conclusión final**

El viejo aserto de que cuánto más se profundiza en un tema, más interrogantes se plantean, resulta ser también cierto para la relación entre *B. pertussis* y el ser humano.

## **8.- BIBLIOGRAFIA**

1. Rabasa M. Un niño con tos persistente. Med Integral 1988;11:167-75.
2. Morse SI. Enfermedades causadas por *Bordetella pertussis*. En: Beeson PB, McDermott W, editores. Tratado de Medicina Interna de Cecil-Loeb. México: Interamericana, 1968:203-6.
3. Cherry JD, Brunell PhA, Golden GS, Karzon DT. Report of the Task Force on pertussis and pertussis immunization- 1988. Pediatrics 1988;81(Suppl)6:939-84.
4. Monack D, Munoz JJ, Peacock MG, Black WJ and Falkow S. Expression of pertussis toxin correlates with pathogenesis in *Bordetella pertussis* species. J Infect Dis 1989;159:205-10.
5. Novotny P. Pathogenesis in *Bordetella pertussis* species. J Infect Dis 1990;161:581-2.
6. Monack D, Falkow S. Pathogenesis in *Bordetella pertussis* species (reply). J Infect Dis 1990;161:582-3.
7. Granström MM and Askelöf P. Parapertussis: an abortive pertussis infection?. Lancet 1982;2:1249-50.
8. Mertsola J. Mixed outbreak of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infection in Finland. Eur J Clin Microbiol 1985;4:123-8.



9. Pittman M. The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. *Pediatric Infect Dis* 1984;3:467-86.
10. Hewlett EL. Especies de *Bordetellas*. En: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE. editores. *Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*. Buenos Aires: Panamericana 1991:1857-62.
11. Christie CDC, Peds DM, Baltimore RS. Pertussis in neonates. *Am J Dis Child* 1989;143:1199-1202.
12. Grahnquist L, Eriksson M. Pertussis and necrotizing enterocolitis in a previously healthy neonate. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:698-9.
13. Sotomayor J, Weiner LB, McMillan JA. Inaccurate diagnosis in infants with pertussis. *Am J Dis Child* 1985;139:724-7.
14. Olson LI C. Pertussis. *Medicine* 1975;54:427-69.
15. Wright PF. Pertussis in developing countries: definition of the problem and prospects for control. *Rev Infect Dis* 1991;13(6 suppl):S528-34.
16. Rey Calero J. *Haemophilus y Bordetella*. En: Rey Calero J editor. *Microbiología e inmunología de las enfermedades infecciosas*. Madrid: Marban, 1980:355-61.

17. Hewlett EL. Selective primary health care: strategies for control of disease in the devolving world. Pertussis and diphtheria. Rev Infect Dis 1985;7:426-33.
18. Archivist. Pertussis, pertussis, pertussis [Editorial]. Arch Dis Child 1992;67:899.
19. Fulginiti VA. The current state of pertussis and pertussis vaccines. A report on the Fifth International Symposium on Pertussis. Am J Dis Child 1989;143:532-3.
20. Centers for Disease Control. Recommendation of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). Diphtheria, tetanus, and pertussis: guidelines for vaccine prophylaxis and other preventive methods. MMWR 1985;34: 405-26.
21. Sprauer MA, Cochi SL, Zell ER, Sutter RW, Mullen JR, Englender SJ, Patriarca PA. Prevention of secondary transmission of pertussis in households with early use of erythromycin. Am J Dis Child 1992;146:177-81.
22. Aoyama T, Takeuchi Y, Goto A, Iwai H, Murase Y, Iwata T. Pertussis in adults. Am J Dis Child 1992;146:163-6.
23. Etkind P, Lett SM, Macdonald PD, Silva E, Peppe J. Pertussis outbreaks in groups claiming religious exemptions to vaccinations. Am J Dis Child 1992;146:1736.

- 
24. Mink ChM, Cherry JD, Christenson P, Lewis K, Pineda E, Shlian D, Dawson JA, Blumberg DA. A search for *Bordetella pertussis* infection in University students. Clin Infect Dis 1992;14:464-71.
  25. Addiss DG, Davis JP, Meade BD, Burstyn DG, Meissner M, Zastrow JA,, Berg JL, Drinka P, Phillips R. A pertussis outbreak in a Wisconsin Nursing Home. J Infect Dis 1991;164:704-10.
  26. Herwaldt LA. Pertussis in adults. Arch Intern Med 1991;151:1510-2.
  27. Mortimer EA Jr. Pertussis and its prevention: a family affair. J Infect Dis 1990;161:473-9.
  28. Robertson PW, Goldberg H, Jarvie BH, Smith DD, Whybin LR. *Bordetella pertussis* infection: a cause of persistent cough in adults. Med J Aust 1987;146:522-5.
  29. Lambert HP. The carrier state: *Bordetella pertussis*. J Antimicrob Chemother 1986;18(suppl.A):13-6.
  30. Nelson JD. The changing epidemiology of pertussis in young infants. The role of adults as reservoirs of infection. Am J Dis Child 1978;132:371-3.

- 
31. Linnemann CC Jr, Hasenbeny J. Pertussis in the adult. *Annu Rev Med* 1977;28:179-85.
  32. Trollfors B, Rabo E. Whooping cough in adults. *BMJ* 1981;283:696-7.
  33. Bass JW, Stephenson SR. The return of pertussis. *Pediatr Infect Dis J* 1987;6:141-4.
  34. Centers for Disease Control. Pertussis-Washington, 1984. *MMWR* 1985;34:390-400.
  35. Court D, Jackson H, Knox G. The recognition of whooping- cough. *Lancet* 1953;ii:1057-60.
  36. Heininger U, Cherry J, Eckhardt T, Lorenz C, Christenson P, Stehr K. Clinical and laboratory diagnosis of pertussis in the regions of a large vaccine efficacy trial in Germany. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:504-9.
  37. Marcovitch H. Recognising whooping cough. *BMJ* 1986;92:360- 1.
  38. Halperin SA, Bortolussi R, MacLean D, Chisholm N. Persistence of pertussis in an immunized population: results of the Nova Scotia enhanced pertussis surveillance program. *J Pediatr* 1989;115:686-93.

- 
39. Centers for Disease Control. Pertussis surveillance - United States.1986-1988. MMWR 1990;39:57-66.
  40. Mertsola J, Ruuskanen O, Eerola E, Viljanen MK. Intrafamilial spread of pertussis. J Pediatr 1983;103: 359-63.
  41. Nelson KE, Gavitt F, Batt M, Kallick CA, Reddi KT, Levin S. The role of adenoviruses in the pertussis syndrome. J Pediatr 1975;86:335-41.
  42. Nelson WL, Hopkins RS, Roe MH, SM (ASCP), Glode MP. Simultaneous infection with *Bordetella pertussis* and *Respiratory Syncytial Virus* in hospitalized children. Pediatr Infect Dis 1986;5:540-4.
  43. Keller MA, Aftandelians R, Connor JD. Etiology of pertussis syndrome. Pediatr 1980;66:50-5.
  44. Connor JD. Evidence for an etiologic role of adenoviral infections in pertussis syndrome. N Engl J Med 1970;283:390-4.
  45. Sturdy PM, Court SDM, Gardner PS. Viruses and whooping cough. Lancet 1971;2:978.
  46. Baraff LJ, Wilkins J, Wehrle PF. The role of antibiotics, immunizations, and adenoviruses in pertussis. Pediatrics 1978;61:224-30.

- 
47. McGregor J, Ogle JW, Curry-Kane G. Perinatal pertussis. *Obstet Gynecol* 1984;68:582-6.
  48. Granström G, Wretling B, Granström M. Diagnostic value of clinical and bacteriological findings in pertussis. *J Infect* 1991;22:17-26.
  49. Mark A, Granström M. Cumulative incidence of pertussis in an unvaccinated preschool cohort based on notifications, interview and serology. *Eur J Epidemiol* 1991;7:121-6.
  50. Hansman DJ. Whooping cough: diagnosis, prevalence and prevention. *Med J Aust* 1987;146:511-3.
  51. Giammanco A, Chiarini A, Stroffolini T, Mattia D, Chiaramonte M, Moschen ME, Mura I, Rigo G, Taormina S, Sarzana A, Mazza G, Scarpa B. Seroepidemiology of pertussis in Italy. *Rev Infect Dis* 1991;13:1216-20.
  52. Gan VN, Murphy TV. Pertussis in hospitalized children. *Am J Dis Child* 1990;144:1130-4.
  53. Huovila R. Clinical symptoms and complications of whooping cough in children and adults. *Acta Paediatr Scand* 1982; suppl 298:13-20.

- 
54. Gilligan PH, Fisher MC. Importance of culture in laboratory diagnosis of *Bordetella pertussis* infections. J Clin Microbiol 1984; 20: 891-3.
  55. Marcon MJ, Hamoudi AC, Cannon HJ and Hribar MM. Comparison of throat and nasopharyngeal swab specimens for culture diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J Clin Microbiol 1987;25:1109-10.
  56. Ros PW, Cumming CG. Isolation of *Bordetella pertussis* from swabs. BMJ 1981;283:403-4.
  57. Regan J. The laboratory diagnosis of whooping cough. Clin Microbiol Newsl 1980; 2: 1-3.
  58. Darling WM. Bacteriological diagnosis of pertussis. Lancet 1983;1:246-7.
  59. Preston NW. Recognising whooping cough. BMJ 1986;292: 901-2.
  60. Linnemann CC Jr, Partin JC, Perlstein PH, Englander JS. Pertussis: persistent problems. J Pediatr 1974;85:589-91.
  61. Centers for Disease Control. Case definitions for public health surveillance. MMWR 1990; 39( No. RR-13): 26-7.

- 
62. Isacson J, Trollfors B, Taranger J, Zackrisson G, Lagergard T. How common is whooping cough in a nonvaccinating country?. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:284- 8.
  63. Thomas MG, Ashworth, Miller E, Lambert HP. Serum IgG,IgA and IgM responses to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and agglutinogens 2 and 3 after infection with *Bordetella pertussis* and immunization with whole- cell pertussis vaccine. *J Infect Dis* 1989;160:838-45.
  64. Broome CV, Preblud SR, Bruner B, McGowan JE, Hayes PS, Harris PP, Elseaw, Fraser DW. Epidemiology of pertussis, Atlanta, 1977. *J Pediatr* 1981;98:362-7.
  65. Blackwelder WC, Storsaeter J, Olin P, Hallander HO. Acellular pertussis vaccines. Efficacy and evaluation of clinical case definitions. *Am J Dis Child* 1991;145:1285-9.
  66. Farizo KM, Cochi SL, Zell ER, Brink EW, Wassilak SG, Patriarca PA. Epidemiological features of pertussis in the United States, 1980-1989. *Clin Infect Dis* 1992;14:708-19.
  67. Brachman PS. Epidemiología y enfermedades infecciosas. Principios y métodos. En: *Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*. Ed: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE. Panamericana: Buenos Aires 1991:153-61.



- 
68. Hodder SL, Mortimer EA Jr. Epidemiology of Pertussis and reactions to pertussis vaccine. *Epidemiol Rev* 1992;14:243-
  69. Biellik RJ, Patriarca PA, Mullen JR, Rovira EZ, Brink EW, Mitchell P, Hamilton GH, Sullivan BJ, Davis JP. Risk factors for community- and household-acquired pertussis during a large-scale outbreak in Central Wisconsin. *J Infect Dis* 1988;157:1134-41.
  70. Binkin NJ, Salmaso S, Tozzi AE, Scuderi G, Greco D. Epidemiology of pertussis in a developed country with low vaccination coverage: the Italian experience. *Pediatr Infect Dis J* 1992;11:653-61.
  71. Cherry JD. The epidemiology of pertussis and pertussis immunization in the United Kingdom and the United States: a comparative study. *Curr Prob Pediatr* 1984;14:1-78.
  72. Fine PEM, Clarkson JA. Seasonal influences on pertussis. *Int J Epidemiol* 1986;15:237-47.
  73. Huovila R. Two epidemics of whooping cough in Finland 1976-1977; age and vaccination of the patients, DPT vaccination rate in children in the epidemic areas, home exposure attack rates and symptomless bacteria carriers. *Acta Paediatr Scand* 1982; suppl 298:5-9.

- 
74. Kimura M, Kuno-Sakai H. Current epidemiology of pertussis in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:705-9.
  75. Romanus V, Jonsell R, Bergquist SO. Pertussis in Sweden after the cessation of general immunization in 1979. *Pediatr Infect Dis J* 1987;6:364-71.
  76. Thomas MG. Epidemiology of Pertussis. *Rev Infect Dis* 1989;11:255-62.
  77. Broome CV, Fraser DW. Pertussis in the United States 1979: a look at vaccine efficacy. *J Infect Dis* 1981;144:187-90.
  78. Centers for Disease Control: Pertussis. *MMWR* 1987;36:168- 171.
  79. Centers for Disease Control. Diphtheria, tetanus, and pertussis: recommendations for vaccine use and other preventive measures: recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). *MMWR*. 1991;40(No.RR- 10):1-28.
  80. Centers for Disease Control. Pertussis surveillance, 1979- 1981. *MMWR* 1982;31:333-6.
  81. Centers for Disease Control. Pertussis-United States, 1982-1983. *MMWR* 1984;33:573-5.

- 
82. Centers for Disease Control. Pertussis surveillance-United States, 1984-1985. *MMWR* 1987;36:168-71.
  83. Centers for Disease Control. Summary of notifiable diseases. United States 1990. *MMWR* 1991;39:1-61.
  84. Sutter RW, Cochi SL. Pertussis hospitalizations and mortality in the United States, 1985-1988. *JAMA* 1992; 267:386-92
  85. Hinman AR, Koplan JP. Pertussis and pertussis vaccine: reanalysis of benefits, risks and cost. *JAMA* 1984; 251: 3109-13.
  86. Dirección General de Salud Pública. Ministerio de Sanidad y Consumo. Vigilancia epidemiológica de la tosferina. España. Años 1982 a 1985. *Boletín Epidemiológico Semanal* 1986;1728:49-51.
  87. Consejería de Salud de la Comunidad de Madrid. Encuesta seroepidemiológica en la Comunidad de Madrid (Sistema de serovigilancia). Madrid: Comunidad de Madrid, 1990.
  88. Servicio Regional de la Salud. Centinelas: semana 16. Avance epidemiológico semanal 1991: semana 18.

- 
89. Bordet J, Gengou D. Le microbe de la coqueluche. Ann Inst Pasteur 1906;20:731-41.
  90. Smith JWG. *Haemophilus and Bordetella*. En Wilson GS, Miles AA and Parker MT editores. Topley and Wilson's Principles of bacteriology, virology and immunity. London: Edward Arnold 1983:379-405.
  91. Smith JWG. Bacterial infections of the respiratory tract. En Wilson GS, Miles AA and Parker MT editores. Topley and Wilson's Principles of bacteriology, virology and immunity. London: Edward Arnold 1983:391-406.
  92. Wilson GS, Miles AA editores. *Haemophilus and Bordetella*. Topley and Wilson's Principles of bacteriology, virology and immunity. London: Edward Arnold 1975:1017-53.
  93. Pittman M. Genus *Bordetella* Moreno López 1952. En: Krieg NR, Holt JG, editores. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore/London: Williams and Wilkins, 1984:388-93.
  94. Moreno Lopez M. El género *Bordetella*. Microbiol Esp 1952;5:177-81.
  95. Perea EJ. In Memoriam Dr. Manuel Moreno López: El Género *Bordetella*. Enf Inf Microbiol Clin 1990;8:480-5.

- 
96. Kloos WE, Mohapatra N, Dobrogosz WJ, Ezzell JW, Manclark CR. Deoxyribonucleotide sequence relationships among *Bordetella* species. Int J Syst Bacteriol 1981;31:173-6.
  97. Musser JM, Hewlett EL, Peppler MS, Selander RK. Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* species. J Bacteriol 1986; 166:230-38.
  98. Marchitto KS, Smith SG, Loch C, Keith JM. Nucleotide sequence homology to pertussis toxin gene on *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. Infect Immun 1987;55:497-501.
  99. Arico B, Rappuoli R. *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. J Bacteriol 1987; 169:2847- 53.
  100. Kumazawa NH and Yoshikawa M. Conversion of *Bordetella pertussis* and *B. parapertussis*. J Hyg 1978;81:15-23.
  101. Linnemann CC and Perry EB. *Bordetella parapertussis*: recent experience and a review of the literature. Am J Dis Child 1977;131:560-3.
  102. Gilchrist MJR. Laboratory diagnosis of pertussis. Clin Microbiol Newsl 1990;12:49-53.

- 
103. Gilchrist MJR. Pertussis: pathophysiology and prevention. Clin Microbiol Newsl 1990;12:17-20.
  104. Goodnow RA. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol Rev 1980;44:722-38..
  105. Woolfrey BF, Moody JA. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. Clin Microbiol Newsl 1991;4:243-55.
  106. Winters JL, O'Connor WN, Broughton RA, Noonan JA. *Bordetella bronchiseptica*. Pneumonia in a patient with Down syndrome: a case report and review. Pediatric 1992;89:1262-5.
  107. Amador C, Chiner E, Calpe JL, Ortiz V, Martinez C, Pasquau F. Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with AIDS. Rev Infect Dis 1991;13:771-2.
  108. Bauwens JE, Spach DH, Schacker TW, Mustafa MM, Bowden RA. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia and bacteremia following bone marrow transplantation. J Clin Microbiol 1992;30:2474-5.
  109. Decker GR, Laville JP, Kumar PN, Pierce PF. Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with AIDS. Rev Infect Dis 1991;13:1250-1.

110. Valerie L, Boggs M, York MK, Hadley WK. Recovery of *Bordetella bronchiseptica* from patients with AIDS. Clin Infect Dis 1992;15:376-7.
111. Kersters K, Hinz KH, Hertle A. *B. avium* sp.nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. Intl J Syst Bacteriol 1984;34:56-70.
112. Bruckner DA, Colonna P. Nomenclature for aerobic and facultative bacteria. Clin Infect Dis 1993; 16: 598-603.
113. Parker CD, Payne BJ. *Bordetella*. In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr and Shadomy HJ eds. Manual of clinical microbiology, 4th ed. Washington DC: American Society for Microbiology. 1985:394-9.
114. Mertsola J, Kuronen T, Turunen A, Viljanen MK, Ruuskanen O. Diagnosis of pertussis. J Infect 1984;8:149-56.
115. Goodman YE, Wort AJ, Jackson F. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of pertussis immunoglobulin A in nasopharyngeal secretions as an indicator of recent infection. J Clin Microbiol 1981;13:286-92.
116. Huovila R. The effect of early erythromycin treatment on the infectiousness of whooping cough patients. Acta Paediatr Scand 1982; suppl 298:10-2.

- 
117. Weiss AA, Hewlett EL. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. Annu Rev Microbiol 1986;40:661-86.
  118. Friedman RL. Pertussis:: the disease and new diagnostic methods. Clin Microbiol Rev 1988;1:365-76.
  119. Lawrence AJ, Paton JC. Efficacy of enzyme-linked immunosorbent assay for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J Clin Microbiol 1987;25:2102-4.
  120. Onorato IM, Wassilak SGF. Laboratory diagnosis of pertussis: the state of the art. Pediatr Infect Dis J 1987;6:145-51.
  121. Bass JW, Klenk EL, Kotheimer JB, Linnemann CC, Smith MHD. Antimicrobial treatment of pertussis. J Pediatr 1969;75:768-81.
  122. Bass JW. Erythromycin for pertussis: probable reasons for past failures. Lancet 1985;2:147.
  123. Bass JW. Pertussis: current status of prevention and treatment. Pediatr Infect Dis 1985;4:614-9.
  124. Bass JW. Erythromycin for treatment and prevention of pertussis. Pediatr Infect Dis 1986;5:154-7.



125. Bergquist SO, Bernander S, Dahnsjö H, Sundelöf B. Erythromycin in the treatment of pertussis: a study of bacteriologic and clinical effects. *Pediatr Infect Dis J* 1987;6:458-61.
126. Torre D, Maggiolo F, Quadrelli C, Sampietro C. Erythromycin estolate for treatment of pertussis. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:719-20.
127. Steketee RW, Wassilak SGF, Adkins WN Jr, Burstyn DG, Manclark ChR, Berg J, Hopfensperger D, Schell WL, Davis JP. Evidence for a high attack rate and efficacy of erythromycin prophylaxis in a pertussis outbreak in a facility for the developmentally disabled. *J Infect Dis* 1988;157:434-40.
128. Storsaeter J, Blackwelder WC, Hallander HO. Pertussis antibodies, protection, and vaccine efficacy after household exposure. *Am J Dis Child* 1992;146:167-72.
129. Granstrom M, Lindberg AA, Askelof P and Hederstedt B. Detection of antibodies in human serum against the fimbriae haemagglutinin of *Bordetella pertussis* by ELISA. *J Med Microbiol* 1982;15:85-96.
130. Tuomanen EI and Hendley JO. Adherence of *Bordetella pertussis* to human respiratory epithelial cells. *J Infect Dis* 1983;148:125-30.

- 
131. Tuomanen E and Weiss A. Characteristics of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory- epithelial cells. Infect Immun 1985;152:118-25.
  132. Tuomanen E. Adherence of *Bordetella pertussis* to human cilia: implications for disease prevention and therapy. Microbiology 1986;59-64.
  133. Urisu A, Cowell JI, Manclark CR. Filamentous hemagglutinin has a major role on mediating adherence of *Bordetella pertussis* to human WiDr cells. Infect Immun 1986;52:695- 701.
  134. Weiss AA, Hewlett EL, Myers GA and Falkow S. Pertussis Toxin and extracytoplasmatic adenylate ciclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. J Infect Dis 1984;150:219-22.
  135. Pittman M. Pertussis toxin: the cause of the harmful effects and prolonged immunity of whooping cough: a hypothesis. Rev Infect Dis 1979; 1: 401-421.
  136. Halperin Sa,. Marrie TJ. Pertussis encephalopathy in an adult. Case report and review. Rev Infect Dis 1991;13:1043-7.

137. Pizza MG, Covacci A, Bartolini A, Perugini M, Nencioni L, De Magistris MT, Villa L, Nucci D, Manetti R, Bugnoli M, Giovannoni F, Olivieri R, Barbieri JT, Sato H, Rappuoli R. Mutans of pertussis toxin suitable for vaccine development. *Science* 1989;246:497-500.
138. Cowell JL, Urisu A, Zhang JM, Steven AC, and Manclark CR. Filamentous hemagglutinin and fimbriae of *Bordetella pertussis*: properties and roles in attachment. *Microbiology* 1986;55-58.
139. Sato Y, Cowell JL, Sato H, Burstyn DG, Manclark CR. Separation and purification of the hemagglutinins from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1983;41:313-20.
140. Thomas MG, Redhead K, Lambert HP. Human serum antibody response to *Bordetella pertussis* infection and pertussis vaccination. *J Infect Dis* 1989;159:211-8.
141. Ashworth LAE, Irons I and Dowsett AB. Antigenic relationship between serotype-specific agglutinin and fimbriae of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1982;37:1278-81.
142. Zhang JM, Cowell JL, Steven AC, Carter AC, McGrath PP and Manclark CR. Purification and characterization of fimbriae isolated from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1985;48:422-27.

- 
143. Anderson EL, Belshe RB and Bartram J. Differences in reactogenicity and Antigenicity of acellular and standard pertussis vaccines combined with diphtheria and tetanus in infants. *J Infect Dis* 1988;157:731-37.
  144. Cowell JL, Sato Y, Sato H, An der Lan B, and Manclark CR. Separation, purification and properties of the filamentous hemagglutinin and the leukocytosis promoting factor- hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Sem Infect Dis* 1984;4:371-79.
  145. Hewlett EL and Weiss AA. Pertussis toxin: mechanism of action, biological effects, and roles in clinical pertussis. *Microbiology* 1986:75-788.
  146. Pittman M, Furman BL and Wardlaw AC. *Bordetella pertussis* respiratory tract infection in the mouse: pathophysiological responses. *J Infect Dis* 1980;142:56-66.
  147. Morse SI. Lymphocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis*. Isolation, characterization and biological activity. *J Infect Dis* 1977;136 (suppl):234S-238S.
  148. Goldman WE, Klapper DG, Baseman JB. Detection, isolation and analysis of the released *Bordetella pertussis* product toxic to cultured tracheal cells. *Infect Immun* 1982;36:782-94.

- 
149. Goldman WE. *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin: damage to the respiratory epithelium. Microbiology 1986;65-9.
  150. Weiss AA, Myers GA, Crane JK and Hewlett EL. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: structure and possible function in whooping cough and the pertussis vaccine. Microbiology 1986;70-4
  151. Hewlett EL, Manclark CR, Wolff J. Adenil cyclase in *Bordetella pertussis* vaccine. J Infect Dis 1977;136 (suppl);216S-219S.
  152. Preston NW, Zorgani AA and Carter EJ. Location of the three major agglutinogens of *Bordetella pertussis* by immuno-electronmicroscopy. J Med Microbiol 1990;32:63-68.
  153. Preston NW. Type-specific immunity against whooping- cough. BMJ 1963;2:724.
  154. Englund JA, Glezen WP, Barreto L. Controlled Study of a new five-component acellular pertussis vaccine in adults and young children. J Infect Dis 1992;166:1436-41.
  155. Shahin RD, Brennan MJ, Li ZM, Meade BD, Manclark CR. Characterization of the protective capacity and immunogenicity of the 69-kD outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. J Exp Med 1990;171:63-73.

- 
156. Brennan MJ, Li ZM, Cowell JL, Bisher ME, Steven AC, Novotny P, Manclark ChR. Identification of 69 kilodalton nonfimbrial protein as an agglutinin or *Bordetella pertussis*. Infect Immun 1988;56:3189-93.
  157. Trollfors B, Zackrisson G, Taranger J, Lagergard T. Serum antibodies against a 69-kilodalton outer-membrane protein, pertactin, from *Bordetella pertussis* in nonvaccinated children with and without a history of clinical pertussis. J Pediatr 1992;120:924-6.
  158. Centers for Disease Control. Pertussis outbreaks- Massachusetts and Maryland, 1992. MMWR 1993;42:197-200.
  159. Strebel PM, Cochi SL, Farizo KM, Payne BJ, Hanauer SD, Baughman AL. Pertussis in Missouri: evaluation of nasopharyngeal culture, direct fluorescent antibody testing, and clinical case definitions in the diagnosis of pertussis. Clin Infect Dis 1993;16:276-85.
  160. Smith DH. Whooping-cough. En Hoeprich PD editor. Infectious Disease. A modern treatise of infectious processes. Philadelphia: Harper and Row 1983:329-32.
  161. Gilligan PH. Laboratory diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. Clin Microbiol Newsl 1983;5:115-7.

- 
162. Hoppe JE. Methods for isolation of *Bordetella pertussis* from patients with whooping cough. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988;7:616-20.
  163. Hoppe JE and Schwaderer J. Direct plating versus use of transport medium for detection of *Bordetella* species from nasopharyngeal swabs. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989;8:264-5.
  164. Morril WE, Barbaree JM, Fields BS, Sanden GN, Martin WT. Effects of transport temperature and medium on recovery of *Bordetella pertussis* from nasopharyngeal swabs. J Clin Microbiol 1988;26:1814-7.
  165. Hoppe JE, Weiss A, Woerz S. Failure of charcoal-horse blood broth with cephalixin to significantly increase the rate of *Bordetella pertussis* isolation from clinical specimens. J Clin Microbiol 1988;26:1248-9.
  166. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clin Infect Dis 1993;17:153-64.
  167. Whitaker JA, Donaldson P, Nelson JD. Diagnosis of pertussis by fluorescent-antibody method. N Engl J Med 1960;263:850-1.
  168. Halperin SA, Bortolussi R, Wort AJ. Evaluation of culture, immunofluorescence, and serology for the diagnosis of pertussis. J Clin Microbiol 1989;27:752-7.

- 
169. Field LH, Parker CD. Pertussis outbreak in Austin and Travis county, Texas, 1975. J Clin Microbiol 1977;6:154- 60.
  170. Regan J and Lowe F. Enrichment medium for the isolation of *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 1977;6:303-9.
  171. Nelson JD, Hempstead B, Tanaka R, Pauls FP. Fluorescent antibody diagnosis of infection. JAMA 1964;188:1121-4.
  172. Hakansson S, Sundin CG, Granström M, Gästrin B. Diagnosis of whooping cough-A comparison of culture, immunofluorescence and serology with ELISA. Scand J Infect Dis 1984;16:281-4.
  173. Young SA, Anderson GL and Mitchell PD. Laboratory observations during an outbreak of pertussis. Clin Microbiol Newsl 1987;9:176-9.
  174. Mertsola J, Ruuskanen O, Kuronen T, Viljanen MK. Serologic diagnosis of pertussis: comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and bacterial agglutination. J Infect Dis 1983;147:252-7.
  175. Harris PP, Thomason B, Mckinney RM. Preservation of nasopharyngeal smears for fluorescent antibody detection of *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 1980;12:799- 801.



- 
176. Fung JC, Tilton RC. Detection of bacterial antigens by counterimmunoelectrophoresis, coagglutination and latex agglutination. En: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr, Shadomy HJ editores. Manual of clinical microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology, 1985:883-90.
  
  177. Boreland PC, Gillespie SH. Counterimmunoelectrophoresis in the diagnosis of whooping cough. J Clin Pathol 1984;37:950-1.
  
  178. Halperin SA, Bortolussi R, Kasina A, Wort AJ. Use of a Chinese Hamster ovary cell cytotoxicity assay for the rapid diagnosis of pertussis. J Clin Microbiol 1990;28:32- 8.
  
  179. Trollfors B, Krantz I, Sigurs N, Taranger J, Zackrisson G, Roberson R. Toxin-neutralizing antibodies in patients with pertussis, as determined by an assay using Chinese hamster ovary cells. J Infect Dis 1988;158:991-5.
  
  180. Friedman RL, Paulaitis S, McMillan JW. Development of a rapid diagnostic test for pertussis: direct detection of pertussis toxin in respiratory secretions. J Clin Microbiol 1989;27:2466-70.

- 
181. Eriksson M, Granströmm G, Wretlind B, Granström M, Askelöf P. *Bordetella pertussis* adenilate cyclase activity in nasopharyngeal aspirates for rapid diagnosis of whooping cough in relation to culture and serology. Scand J Infect Dis 1991;23:731-6.
  182. Eisenstein BI. The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N Engl J Med 1990;322:178-83.
  183. DeMarchi JM. The polymerase chain reaction. Clin Microbiol Newsl 1990;12:81-4.
  184. Schutzbank TE, Stern HJ. Principles and applications of the polymerase chain reaction. J Int Fed Clin Chem 1993;5:96-105.
  185. Reizenstein E, Löfdahl S, Granström M, Granström G, Alsheikhly AR. Evaluation of an improved DNA probe for diagnosis of pertussis. Diagn Microbiol Infect Dis 1992; 15:569-73.
  186. He Q, Mertsola J, Soini H, Skurnik M, Ruuskanen O, Viljanen MK. Comparison of polymerase chain reaction with culture and enzyme immunoassay for diagnosis of Pertussis. J Clin Microbiol 1993;31:642-5.

- 
187. Glare EM, Paton JC, Premier RR, Lawrence AJ, Nisbet I. Analysis of a repetitive DNA sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1990;28:1982-7.
  188. Gustafsson B, Lindquist U, Andersson M. Production and characterizations of monoclonal antibodies directed against *Bordetella pertussis* lipopolysaccharide. J Clin Microbiol 1988;26:188-93.
  189. Gustafsson B, Askelöf. Rapid detection of *Bordetella pertussis* by a monoclonal antibody-based colony blot assay. J Clin Microbiol 1989;27:628-31.
  190. Sanden GN, Cassiday PK, Barbaree JM. Rapid immunodot technique for identifying *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 1993;31:170-2.
  191. Ryan RW, Kwasnik I. Specific immunoglobulin detection. En: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr, Shadomy HJ editores. Manual of clinical microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology, 1985:877-82.
  192. James K. Immunoserology of infectious diseases. Clin Microbiol Rev 1990;3:132-52.

- 
193. Aftandelians R, Connor JD. Bactericidal antibody in serum during infection with *Bordetella pertussis*. J Infect Dis 1973;128:555-8
  
  194. Palmer DF, Whaley SD. Complement fixation test. En: Rose NR, Friedman H, Fahey JL editores. Manual of clinical laboratory immunology. Washington DC: American Society for Microbiology 1986:57-66.
  
  195. Peters SM, Bellanti JA. Neutralization assays. En: Rose NR, Friedman H, Fahey JL editores. Manual of clinical laboratory immunology. Washington DC: American Society for Microbiology 1986:67-71.
  
  196. Nichols WS, Nakamura RM. Agglutination and agglutination inhibition assays. En: Rose NR, Friedman H, Fahey JL editores. Manual of clinical laboratory immunology. Washington DC: American Society for Microbiology 1986: 49-56.
  
  197. Cherry WB. Immunofluorescence techniques. En: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr, Truant JP editores. Manual of clinical microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology 1980:501-8.
  
  198. Yolken RH. Enzyme immunoassays for the detection of infectious antigens in body fluid: current limitations and future prospects. Reviews Infect Dis 1982;4:35-68.

- 
199. Public Health Laboratory Service. Diagnosis of whooping cough: comparison of serological test with isolation of *Bordetella pertussis*. A combined Scottish study. BMJ 1970;4:637-9.
  200. Granström M, Granström G, Gillenius P, Askölof P. Neutralizing antibodies to pertussis toxin in whooping cough. J Infect Dis 1985;151:646-9.
  201. Farfel Z, Könen S, Wiertz E, Klapmuts R. Antibodies to *Bordetella pertussis* adenylate cyclase are produced in man during pertussis infection and after vaccination. J Med Microbiol 1990;32:173-7.
  202. Arciniega JC, Hewlett EL, Johnson FD, Deforest A, Wassilak SGF, Onorato IM, Manclark ChR, Burns D. Human serologic response to envelope-associated proteins and adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. J Infect Dis 1991;163:135-42.
  203. Manclark ChR, Meade BD, Burstyn DG. Serological response to *Bordetella pertussis*. En: Rose NR, Friedman H, Fahey L editores. Manual of clinical laboratory immunology. Washington DC: American Society for Microbiology 1986:388-94.
  204. Prasad R, Saran G. Agglutinin directed against *Bordetella pertussis* in a Chicago population. J Infect Dis 1983;147:959.

- 
205. Juan L, Fuentes X. Propuesta de nomenclatura: sustitución de <<título>> por concentración. Boletín Informativo Sociedad Española de Química Clínica 1993;73:18.
  206. Thompson KD, Van Enk RA. Changing technologies in immunodiagnosis: enzyme immunoassays versus immunofluorescence assays. Clin Microbiol Newsl 1991;13:73-6.
  207. Campbell PB, Masters PL, Rohwedder E. Whooping cough diagnosis: a clinical evaluation of complementing culture and immunofluorescence with enzyme-linked immunosorbent assay of pertussis immunoglobulin A in nasopharyngeal secretions. J Med Microbiol 1988; 27: 247-54.
  208. Conway SP, Balfour AH, Frcpath HR. Serologic diagnosis of whooping cough by enzyme-linked immunosorbent assay. Pediatr Infect Dis J 1988;7:570-4.
  209. Hallander HO, Storsaeter J, Möllby R. Evaluation of serology and nasopharyngeal cultures for diagnosis of pertussis in a vaccine efficacy trial. J Infect Dis 1991; 163:1046-54.
  210. Granström G, Wretlind B, Salenstedt CR, Granström M. Evaluation of serologic assays for diagnosis of whooping cough. J Clin Microbiol 1988;26:1818-23.

- 
211. Mertsola J, Ruuskanen O, Kuronen T, Meurman O, Viljanen MK. Serologic diagnosis of pertussis: evaluation of pertussis toxin and other antigens in enzyme-linked immunosorbent assay. *J Infect Dis* 1990;161:966-71.
  212. Granström M, Granström G, Lindfors A and Askölof P. Serologic diagnosis of whooping cough by an enzyme linked immunosorbent assay using fimbrial hemagglutinin antigen. *J Infect Dis* 1982;146:741-5.
  213. Nakamura RM. Immunoenzyme histochemical methods. Immunopathology. Clinical laboratory concepts and methods. United States of American: Little, Brown and Company Boston 1974:650-70.
  214. Hill HR, Matsen JM. Enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay in the serologic diagnosis of infectious diseases. *J Infect Dis* 1983;147:258-63.
  215. Mulholland EK. Pertussis vaccine: a time-bomb?. *Lancet* 1990; June 30:1592.
  216. Fine PEM, Clarkson JA. The recurrence of whooping cough: possible implications for assessment of vaccine efficacy. *Lancet* 1982;i:666-9.
  217. Report from the PHLS epidemiological research laboratory and 21 area health authorities. Efficacy of pertussis vaccination in England. *BMJ* 1982;285:357-9.

- 
218. Long SS, Welkon CJ, Clark JL. Widespread silent transmission of Pertussis in families: antibody correlates of infection and symptomatology. *J Infect Dis* 1990;161:480-6.
  219. Thomas MG, Lambert HP. From whom do children catch pertussis?. *BMJ* 1987;295:751-2.
  220. Linnemann CC Jr, Bass JW, Smith MHD. The carrier state in pertussis. *Am J Epidemiol* 1968;88:422-7.
  221. Kurt TL, Yeager AS, Guenette S, Dunlop S. Spread of pertussis by hospital staff. *JAMA* 1972;221:264-7.
  222. Ey JL, Duncan B, Barton LL, Buckett G. The influence of preschool pertussis immunization on an epidemic of pertussis. *Pediatr Infect Dis J*. 1991;10:576-8.
  223. Church MA. Evidence of whooping-cough-vaccine efficacy from the 1978 whooping cough epidemic in Hertfordshire. *Lancet* 1979;ii:188-90.
  224. Jenkinson D. Duration of effectiveness of pertussis vaccine: evidence from a 10 year community study. *Br Med J* 1988;269:612-4.
  225. Preston NW. Protection by pertussis vaccine. Little cause for concern. *Lancet* 1976; 1: 1065-7.



- 
226. Fine PEM, Clarkson JA. Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. *Rev Infect Dis* 1987;5:866-83.
227. Krantz I, Taranger J, Trollfors B. Estimating incidence of whooping cough over time: a cross-sectional recall study of four Swedish birth cohorts. *Int J Epidemiol* 1989;18:959-63.
228. Report from Swansea Research Unit of the Royal College of General Practitioners. Effect of a low pertussis vaccination uptake on a large community. *BMJ* 1981;282:23-6.
229. Jenkinson D. Whooping cough: what proportion of cases is notified in a epidemic?. *BMJ* 1983;287:185-6.
230. Clarkson JA, Fine PEM. The efficiency of measles and pertussis notification in England and Wales. *Int J Epidemiol* 1985;14:153-68.
231. Censo de población 1990. Avance de resultados. Ed. Instituto Nacional de Estadística. Madrid 1991.
232. Jenicek M y Cléroux R. Epidemiología: Principios - Técnicas-Aplicaciones. Ed. Barcelona: Salvat, 1987.
233. Rothman KJ. Epidemiología moderna. Ed. Madrid: Diaz de Santos, 1987.

- 
234. Dean J, Dean M, Burton A and Dicker R. Epi. Info. (programa informático). Versión 5.01. Centers for Disease Control. Epidemiology Program Office. Atlanta 1990.
235. Kurzynski TA, Boehm DM, Rott-Petri JA, Schell RF, Allison PE. Comparison of modified Bordet-Gengou and modified Regan-Lowe media for the isolation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. J Clin Microbiol 1988;26:2661-3.
236. Hoppe JE, Woerz S, Botzenhart K. Comparison of specimen transport systems for *Bordetella pertussis*. Eur J Clin Microbiol 1986;5:671-3.
237. Hunter PR, Survival of *Bordetella pertussis* in transport media. J Clin Pathol 1986;39:119-20.
238. Hoppe JE and Weiß A. Recovery of *Bordetella pertussis* from four kind of Swabs. Eur J Clin Microbiol 1987;6:203-5.
239. Hoppe JE. Recovery of *Bordetella pertussis* from nasopharyngeal swabs. J Clin Microbiol 1989; 27: 595-6.
240. Hoppe JE and Vogl R. Comparison of three media for culture of *Bordetella pertussis*. Eur J Clin Microbiol 1986;5:361- 3.

- 
241. Stauffer LR, Brown DR, Sandstrom RE. Cephalixin- supplemented Jones-Kendrick charcoal agar for selective isolation of *Bordetella pertussis*: comparison with previously described media. J Clin Microbiol 1983;17:60-2.
242. Hoppe JE and Schlagenhauf M. Comparison of three kinds of blood and two incubation atmospheres for cultivation of *Bordetella pertussis* on Charcoal agar. J Clin Microbiol 1989;27:2115-7.
243. Hoppe JE and Schwaderer J. Comparison of four charcoal media for the isolation of *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 1989;27:1097-8.
244. Wirsing von Koenig CH, Tacken A, Finger H..Use of supplemented Stainer-Scholte broth for the isolation of *Bordetella pertussis* from clinical material. J Clin Microbiol 1988;26:2558-60.
245. Imaizumi A, Suzuki Y, Ono S, Sato H, and Sato Y. Heptakis (2,6-O-dimethyl)β-cyclodextrin: a novel growth stimulant for *Bordetella pertussis* phase I. J Clin Microbiol 1983;17:781-6.
246. Aoyama T, Murase Y, Iwata T, Imaizumi A, Suzuki Y, Sato Y. Comparison of blood-free medium (Cyclodextrin solid medium) with Bordet-Gengou medium for clinical isolation of *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 1986;23:1046- 8.

- 
247. Ahmad F, Calder MA. Isolation of *Bordetella pertussis*: benefits of using both Bordet-Gengou and charcoal agar media. J Clin Pathol 1984;37:1071-2.
248. Solberg HE. Establishment and use of reference values. En: Tietz NW editor. Textbook of clinical chemistry. Philadelphia: Saunders WB 1986:356-86.
249. Armitage P, Berry G, editores. Estadística para la investigación biomédica. Barcelona: Doyma 1992.
250. Gardner MJ, Altman DG. Calculating confidence intervals for proportions and their differences. En: Gardner MJ, Altman DG editores. Statistics with confidence-confidence intervals and statical guidelines. London: British Medical Journal 1989:28-33.
251. Henderson AR. Chemistry with confidence: should Clinical Chemistry require confidence intervals for analytical and other data?. Clin Chem 1993;39:929-35.
252. Ilstrup DM. Statical methods in Microbiology. Clin Microbiol Rev 1990;3:219-26.
253. International Federation of Clinical Chemistry expert panel on theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. J Clin Chem Clin Biochem 1979;17:337- 9.

- 
254. International Federation of Clinical Chemistry, International Committee for Standardization in Haematology. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:645-56.
255. Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos de uniformidad para manuscritos presentados a revistas biomédicas. *Med Clin (Barc)* 1991;97:181-6.
256. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Clin Biochem* 1991;28:532-41.
257. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *N Engl J Med* 1991;324:424-8.
258. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *BMJ* 1991;302:338-41.
259. Mortimer EA. Pertussis immunization: Problems, perspectives, prospects. *Hosp Pract* 1980;15:103-118.

- 
260. Krantz I, Alestig K, Trollfors B, Zackrisson G. The carrier state in pertussis. Scand J Infect Dis 1986;18:121-3.
261. Centers for Disease Control. Annual Summaries. MMWR 1984;32:114-21. (desde 1934 hasta 1983)
262. Centers for Disease Control. Pertussis Surveillance-United States, 1989-1991. MMWR 1992;41 (SS-8):11-9.
263. Baker JD, Halperin SA, Edwards K, Miller B, Decker M, Stephens D. Antibody response to *Bordetella pertussis* antigens after immunization with American and Canadian whole-cell vaccines. J Pediatr 1992;121:523-7.
264. Zackrisson G, Taranger J, Trollfors B. History of whooping cough in nonvaccinated swedish children, related to serum antibodies to pertussis toxin and filamentous hemagglutinin. J Pediatr 1990;116:190-4.
265. Mortimer EA, Kimura M, Cherry JD, Kuno-Sakai H, Stout MG, Dekker CL, Hayashi R, Miyamoto Y, Scott J, Aoyama T, Isomura S, Iwata T, Kamiya H, Kato T, Noya J, Suzuki E, Takeuchi Y, Yamaoka H. Protective efficacy of the Takeda acellular Pertussis vaccine combined with Diphtheria and Tetanus Toxoids following household exposure of japanese children. Am J Dis Child 1990;144:899-904.

- 
266. Blennow M, Olin P, Granström M, Bernier RH. Protective - efficacy of whole cell pertussis vaccine. Br Med J 1988;296:1570-2.
267. Provenzano RW, Wetterlow LH, Sullivan ChL. Immunization and antibody response in the newborn infant. I. Pertussis inoculation within twenty-four hours of birth. New Eng J Med 1965;273:959-65-
268. Centers for Disease Control. Pertussis vaccination: acellular pertussis vaccine for reinforcing and booster use-Supplementary ACIP Statement. Recommendations of the immunization Practices Advisory Committee (ACIP). MMWR 1992;41(RR-1):1-10.
269. Bradstreet P, Tannahill AJ, Edwards JMB, Benson PF. Detection of *Bordetella pertussis* antibodies in human sera by complement-fixation and immunofluorescence. J Hyg (Camb) 1972;70:75-83.
270. Bass JW, Zacher LL. Do newborn infants have passive immunity to pertussis?. Pediatr Infect Dis J 1989;8:352-3.
271. Bass JW. Passive immunity to pertussis in newborns. Pediatr Infect Dis J 1990;9:374-5.
272. George RH, Path FRC. Passive immunity to pertussis in newborns. Pediatr Infect Dis J 1990;9:374.

- 
273. Roitt IM. Inmunidad a la infección. I.Estrategias contrarias. En: IM Roitt editor. *Inmunología Esencial*. Barcelona: JIMS SA. 1989:154-71.
274. Martin Du Pan R. The vaccination of the newborn infant against pertussis. *J Pediatr* 1958;53:180-6..
275. Amstey MS, Insel RA, Pichichero ME. Neonatal passive immunization by maternal vaccination. *Obstet Gynecol* 1984;63:105-9.
276. Cohen P, Scandron SJ. The placental transmission of protective antibodies against whooping cough by inoculation of the pregnant mother. *JAMA* 1943;121:656-62.
277. Granström G, Granström M, Sterner G. Whooping-cough in late pregnancy. *Scand J Infect Dis* 1990 (suppl 71):27-9.
278. Baraff LJ, Leake RD, Burstyn DG, Payne T, Cody ChL, Manclark ChR, Geme JW. Immunologic response to early and routine DTP immunization in infants. *Pediatr* 1984;73:37- 42.
279. Savage JV, Decker MD, Edwards KM, Sell SH, Karzon DT. Natural history of pertussis antibody in the infant and effect on vaccine response. *J Infect Dis* 1990;161:487-92.



- 
280. Barkin RM, Samuelson JS, Gotlin LP. DTP reactions and serologic response with a reduced dose schedule. *J Pediatr* 1984;105:189-94.
281. Tomoda T, Ogura H, Kurashige T. Immune responses to *Bordetella pertussis* infection and vaccination. *J Infect Dis* 1991;163:559-63.
282. Blumberg DA, Pineda E, Cherry JD, Caruso A, Scott JV. The agglutinin response to whole-cell and acellular pertussis vaccines is *Bordetella pertussis*-strain dependent. *Am J Dis Chil* 1992;146:1148-50
283. Locht C, Keith JM. Can pertussis be eradicated by vaccination?. *Lancet* 1978; March 28:738.
284. Moxon ER, Rappuoli R. *Haemophilus influenzae* infections and whooping cough. *Lancet* 1990;335:1324-9.
285. Blennow M, Granström M. Longterm serologic follow-up after pertussis immunization. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:21-6.
286. Sako W. Studies on pertussis immunization. *J Pediatr* 1974;30:29-40.

- 
287. A report to the Whooping-Cough Immunization Committee of the Medical Research Council and to the Medical Officers of Health for Cardiff, Leeds, Leyton, Manchester, Middlesex, Oxford, Poole, Tottenham, Walthamstow, and Wembley. Vaccination against whooping-cough. Relation between protection in children and results of laboratory test. *Br Med J* 1956;Aug 25:454-62.
288. Ramsay M, Begg N, Corbel MJ. Accelerated immunisation with diphtheria-tetanus-pertussis vaccine. *Br Med J* 1991;303:648-9.
289. Preston NW. Accelerated immunisation with diphtheria- tetanus-pertussis vaccine. *Br Med J* 1991;303:248.
290. Preston NW. Pertussis vaccine. *Lancet* 1990;335:1162.
291. Ramsay MEB, Corbel MJ, Redhead K, Ashworth LAE, Begg NT. Persistence of antibody after accelerated immunisation with diphtheria/tetanus/pertussis vaccine. *Br Med J* 1991; 302:1489-91.
292. Blake KD, Jelline DC. Visiting and immunisation policies on a regional neonatal unit. *Lancet* 1990;336:308-9..
293. Palmer Rs. Vaccine efficacy and control measures in pertussis. *Arch Dis Child* 1991;66:854-7.

- 
294. Cherry JD, Holtzman AE, Shields WD, Buch D, Nielsen C, Jacobsen V, Christenson PD, Zachau-Christiansen B. Pertussis immunization and characteristics related to first seizures in infants and children. *J Pediatr* 1993;122:900-3.
  295. Robbins JB, Pittman M, Trollfors B, Lagergard TA, Taranger J, Schnneerson R. *Primum non nocere*: a pharmacologically inert pertussis toxoid alone should be the next pertussis vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:795-807.
  296. American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases Acellular Pertussis vaccines: Recommendations for use as the fourth and fifth doses. *Pediatr* 1992;90:121-3.
  297. Centers for Disease Control. Pertussis vaccination: Acellular Pertussis vaccine for the fourth and fifth doses of the DTP series update to supplementary ACIP Statement. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) *MMWR* 1992;41(RR-15):1-5.
  298. Centers for Disease Control. Food and Drug Administration Approval of a Second Diphtheria and Tetanus Toxoids and Acellular Pertussis Vaccine. *MMWR* 1992;41:630-1.
  299. Committee on Infectious Diseases. The status of acellular pertussis vaccines: current perspective. *Pediatrics* 1991;88:401-5.

- 
300. Glode M, Joffe L, The Children's Medical Center, Reisinger K, Blatter M, Plotkin S, Watson B, Grossman L, Pennridge Pediatric Associates, Asmar B, Berry M, Starobin S, Fisch G, Hackell JG, Sheip B, Mckee B. Safety and immunogenicity of acellular pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids in 17- to 24- month-old children. *Pediatr Infect Dis J* 1992;11:530-5.
301. Tomoda T, Oguara H, Kurashige T. . The longevity of the immune response to filamentous hemagglutinin and pertussis toxin in patients with pertussis in a semiclosed community. *J Infect Dis* 1992;116:908-10.
302. Podda A, Carapella De Luca E, Titone L, Casadei AM, Cascio A, Bartalini M, Volpini G, Peppoloni S, Marsili I, Nencioni L, Rappuoli R. Immunogenicity of an acellular pertussis vaccine composed of genetically inactivated pertussis toxin combined with filamentous hemagglutinin and pertactin in infants and children. *J Pediatr* 1993;123:81-4.
303. Bernstein HH, Rothstein EP, Pichichero ME, Francis AB, Kovel AJ, Disney FA, Green JL, Marsocci SM, Lynd AM, Wood GC, Schiller RP, Girone JAC, Hipp TJ, Souder RL, Kennedy TI, Meschivitz CK. Clinical reactions and immunogenicity of the Biken acellular Diphtheria and Tetanus toxoids and Pertussis vaccine in 4- through 6-year-old US Children. *Am J Dis Child* 1992;146:556-9.

- 
304. Long SS, Lischner HW, Deforest A, Clark JL. Serologic evidence of subclinical pertussis in immunized children. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:700-5.
305. Sekura RD, Zhang YL, Roberson R, Acton B, Trollfors B, Tolson N, Shiloach J, Bryla D, Muir-Nash J, Koeller D, Schneerson R, Robbins JB. Clinical, metabolic, and antibody responses of adult volunteers to an investigational vaccine composed of pertussis toxin inactivated by hydrogen peroxide. *J Pediatr* 1988;113:806- 13.
306. Nagel J, de Graaf S, Schijf-Evers D. Improved serodiagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis* by determination of IgG anti-LPF antibody levels. *Dev Biol Stand* 1985;61:353-65.
307. Winsnes R, Lonnes T, Mogster B, Berdal BP. Antibody response after vaccination and disease against leukocytosis promoting factor, filamentous hemagglutinin, lypopolysaccharide and a protein binding to complement- fixing antibodies induced during whooping cough. *Dev Biol Stand* 1985;61:353-65.
308. Nagel J, Poot-Scholtens EJ. Serum IgA antibody to *Bordetella pertussis* as an indicator of infection. *J Med Microbiol* 1983;16:417-26.
309. Macaulay ME. The IgM and IgG response to *Bordetella pertussis* vaccination and infection. *J Med Microbiol* 1981;14:1-7.

- 
310. Orenstein WA, Bernier RH, Hinman AR. Assessing vaccine efficacy in the field: further observations. *Epidemiol Rev* 1988;10:212-41.
311. Orenstein WA, Wassilak SGF, Strebel PM, Bernier RH, Blackwelder WC. Efficacy of pertussis vaccine. *J Pediatr* 1990;117:508-9.
312. Halperin SA, Bortolussi R, Chisholm N, Maclean D. Efficacy of pertussis vaccine. *J Pediatr* 1990;117:508-9.
313. Public Health Laboratory Service Whooping Cough Committee and Working Party. Efficacy of whooping-cough vaccines used in the United Kingdom before 1968. *Br Med J* 1973;i:259-62.
314. Royal College of General Practitioners, Swansea Research Unit. Effect of a low pertussis vaccination uptake on a large community. *Br Med J* 1981;281:23-30.
315. Jenkinson D. Whoopin cough. *Br Med J* 1978;ii:896.
316. Noah N. Attack rates of notified whooping cough in immunised and uninmunised children *Br Med J* 1976;i:357-9.
317. Church MA. Evidence of whooping-cough vaccine efficacy from the 1978 whooping-cough epidemic in Hertfordshire. *Lancet* 1979;2:188-90.

- 
318. Farrington CP. Efficacy of pertussis vaccine. *J Pediatr* 1990;117:509
319. Ad hoc group for the study of pertussis vaccines. Placebo- controlled trial of two acellular pertussis vaccines in Sweden-protective efficacy and adverse events. *Lancet* 1988;1:955-60.
320. Stewart GT. Safety of pertussis vaccine. *Lancet* 1990;335:913-4.
321. Baraff LJ, Shields WD, Beckwith L, Strome G, Marcy M, Cherry JD, Manclark Ch. Infants and children with convulsions and hypotonic-hyporesponsive episodes following diphtheria-tetanus-pertussis immunization: follow-up evaluation. *Pediatrics* 1988;81:789-94.
322. Cody CL, Baraff LJ, Cherry JD, Marcy SM, Manclark ChR. Nature and rates of adverse reactions associated with DTP and DT immunizations in infants and children. *Pediatrics* 1981;68:650-60.
323. Griffin MR, Ray WA, Mortimer EA, Fenichel GM, Schaffner W. Risk of seizures and encephalopathy after immunization with the diphtheria-tetanus-pertussis vaccine. *JAMA* 1990;263:1641-5.

- 
324. Shields WD, Nielsen C, Buch D, Jacobsen V, Christenson D, Zachau-Christiansen B, Cherry JD. Relationship of pertussis immunization to the onset of neurologic disorders: a retrospective epidemiologic study. *J Pediatr* 1988;113:801-805
  325. Walker AM, Jick H, Perera DR, Knauss TA, Thompson RS. Neurologic events following diphtheria-tetanus-pertussis immunization. *Pediatrics* 1988;81:345-349.
  326. Hinman ASR. DTP vaccine litigation. *Am J Dis Child* 1986;140:528-30.
  327. Eggington WRO. Pertussis vaccine. *Lancet* 1990;335:1162.
  328. Brahams D. Pertussis vaccine litigation. *Lancet* 1990;335:905-6.
  329. Brahams D. Pertussis vaccine and brain damage. *Lancet* 1988;i:837.
  330. Miller DL, Ross E, Alderslade R. Pertussis immunization and serious acute neurological illness in children. *Br Med J* 1981;282:1595-99.
  331. Robinson RJ. The whooping cough immunization controversy. *Arch Dis Child* 1981;56:577



- 
332. Menkes JH, Kinsbourne M. Workshop on neurologic complications of pertussis and pertussis vaccination. *Neuropediatrics* 1990;21:171-6.
333. Goh JW, Pennefather PS. A pertussis toxin-sensitive G protein in hippocampal long-term potentiation. *Science* 1989;244:980-3.
334. Blumberg DA, Lewis K, Mink ChM, Christenson PD, Chatfield P, Cherry JD. Severe reactions associated with Diphtheria- Tetanus-Pertussis vaccine: detailed study of children with seizures, hypotonic-hyporesponsive episodes, high fevers, and persistent crying. *Pediatrics* 1993;91:1158-65.
335. Cherry JD. 'Pertussis vaccine encephalopathy': it is time to recognize it as the myth that it is. *JAMA* 1990;263:1679-80.
336. Cherry JD. Acellular Pertussis vaccines-A solution to the Pertussis problem. *J Infect Dis* 1993;168:21-4.
337. American Academy of Pediatrics. Committee on infectious Diseases. The relationship between pertussis vaccine and brain damage: reassessment. *Pediatrics* 1991;88:397-400.
338. Edwards KM. Acellular pertussis vaccines-A solution to the Pertussis problem?. *J Infect Dis* 1993;168:15-20.

- 
339. Hewlett EL, Cowell JL. Evaluation of the mouse model for study of encephalopathy in pertussis vaccine recipients. *Infect Immun* 1989;57:661-3.
340. Golden GS. Pertussis vaccine and injury to the brain. *J Pediatr* 1990;116:854-61.
341. Fulginiti VA. A pertussis vaccine myth dies. *Am J Dis Child* 1990;144:860-1.
342. Wentz DR, Marcuse EK. DTP and severe neurologic illness: an updated review of the epidemiologic evidence. *Pediatrics* 1991;87:287-97.
343. Long SS, Deforest A, Penridge Pediatric Associates, Smith DG, Lazaro C, Wassilak SGF. Longitudinal study of adverse reactions following diphtheria-tetanus-pertussis vaccine in infancy. *Pediatrics* 1990;85:294-302.
344. Pichichero ME, Francis AB, Blatter MM, Reisinger KS, Green JL, Marsocci SM, Disney FA. Acellular pertussis vaccination of 2-month-old infants in the United States. *Pediatrics* 1992;89:882-7.
345. Lewis K, Cherry JD, Holroyd HJ, Baker LR, Dudenhoeffer FE, Robinson RG. A double-blind study comparing an acellular pertussis-component DTP vaccine with a whole-cell pertussis-component DTP vaccine in 18-month-old children. *Am J Dis Child* 1986;140:872-6.

- 
346. Miller DL,, Alderslade R, Ross EM. Whooping cough and whooping cough vaccine: the risks and benefits debate. *Epidemiol Rev* 1982;4:1-24.
347. Aoyama T, Iwata T, Iwai H, Murase Y, Saito T, Akamatsu T. Efficacy of acellular pertussis vaccine in young infants. *J Infect Dis* 1993;167:483-6
348. Edwards KM, Karzon DT. Pertussis vaccines. *Pediatr Clin North Am* 1990;37:549-66.
349. Granström M, Thoren M, Blennow LM, Tiru M, Sato Y. Acellular pertussis vaccine in adults: adverse reactions and immune response. *Eur J Clin Microbiol* 1987;6:18-22.
350. Podda A, Carapella De Luca E, Titone L, Casadei AM, Cascio A, Peppoloni S, Volpini G, Marsili I, Nencioni L, Rappuoli R. Acellular pertussis vaccine composed of genetically inactivated pertussis toxin: safety and immunogenicity in 12- to 24- and 2- to 4-month-old children. *J Pediatr* 1992;120:680-5.
351. Burnette WN, Cieplak W, Mar VL, Kaljot KT, Sato H, Keith JM. Pertussis toxin S1 mutant with reduced enzyme activity and a conserved protective epitope. *Science* 1988;242:72-4.
352. Sociedad Española de Química Clínica. Teoría de los valores de referencia. Documentos de la Comisión Valores de Referencia. Barcelona: SEQC 1993.

- 
353. Trollfors B. *Bordetella pertussis* whole cell vaccines- efficacy and toxicity. Acta Paediatr Scand 1984;73:417-25.
354. Valenti WM, Pincus PH, Messner MK. Nosocomial pertussis: possible spread by a hospital visitor. Am J Dis Child 1980;134:520-1.
355. Williams WO. Whooping cough in adults. Br Med J 1981;283:1122.
356. Fine PEM, Clarkson JA. Distribution of immunity to pertussis in the population of England and Wales. J Hyg 1984;92:21-36.
357. Britten N, Wadsworth J. Long term respiratory sequelae of whooping cough in a nationally representative sample. Br Med J 1986;292:441-4.
358. Anderson RM, May RM. Age-related changes in the rate of disease transmission: implications for the design of vaccination programmes. J Hyg 1985;94:365-436.
359. Fisher MC, Long SS, McGowan KL, Kaselis E, Smith DG. Outbreak of pertussis in a residential facility for handicapped people. J Pediatr 1989;114:934-9.

- 
360. Viljamen MK, Ruuskanen O, Granberg C, Salmi TT. Serological diagnosis of pertussis: IgM, IgA, and IgG antibodies against *Bordetella pertussis* measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Scand J Infect Dis 1982;14:117-22.
361. Bass JW. Is there a carrier state in pertussis?. Lancet 1987;1:96.
362. Linnemann CC Jr, Ramundo N, Perlstein PH, Minton SD. Use of pertussis vaccine in an epidemic involving hospital staff. Lancet 1975;2:540-3.
363. Patriarca PA, Biellik RJ, Sanden G, Burstyn DG, Mitchell PD, Silverman PR, Davis JP, Manclark ChR. Sensitivity and specificity of clinical case definition for Pertussis. Am J Public Health 1988;78:833-6.
364. Freij BJ, McCracken GH Jr. Tos ferina. En: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci ASS, Root RK editores. Harrison. Principios de Medicina Interna. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill 1991:729-32.
365. Steketee RW, Burstyn DG, Wassilak SGF, Adkins WN, Polyak MB, Davis JP, Manclark ChR. A comparison of laboratory and clinical methods for diagnosing pertussis in an outbreak in a facility for the developmentally disabled. J Infect Dis 1988;157:441-9.

- 
366. Mark A, Granström M. Impact of pertussis on the afflicted child and family. *Pediatr Infect Dis J* 1992;11:554-7.
367. Dirección General de Salud Pública. Ministerio de Sanidad y Consumo. Boletines Epidemiológicos Semanales 1987;1767 al año 1992;1942.
368. Ministerio de Sanidad y Consumo. Diagnóstico de Salud Area 10 Madrid. Insalud 1992.
369. Ministerio de Sanidad y Consumo. Memoria 1991 Insalud Madrid. Madrid: Instituto Nacional de la Salud 1992.
370. Grimprel E, Béqué P, Anjak I, Betsou F, Guiso N. Comparison of polymerase chain reaction, culture, and western immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Clin Microbiol* 1993;31:2745-50.
371. Zee A, Agterberg C, Peeters M, Schellekens J, Mooi FS. Polymerase chain reaction assay for pertussis: simultaneous detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *J Clin Microbiol* 1993;31:2134-40.
372. Gilchrist MJR. *Bordetella*. En Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. editores. Manual Clinical Microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology 1991:471-7.

- 
373. Kwantes W, Joynson DHM, Williams WO. *Bordetella pertussis* isolation in general practice:1977-1979 whooping cough epidemic in West Glamorgan. J Hyg 1983;90:49-58.
374. Hallander HO, Reizenstein E, Renemar B, Rasmuson G, Mardin L, Olin P. Comparison of nasopharyngeal aspirates with swabs for culture of *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 1993;31:50-2.
375. Pedersen RC, Knox F. Interpretation of pertussis serologic test. Pediatr Infect Dis J 1991;10:791-2.
376. Cherry JD, Hewlett EL, Mortimer EA Jr. Protective antibodies in pertussis J Pediatr 1990;117:347.
377. Halperin SA. Interpretation of pertussis serologic tests. Pediatr Infect Dis J 1991;10:791-2.
378. Zackrisson G, Krantz I, Lagergard T, Larsson P, Sekura R, Sigurs N, Taranger J, Trollfors B. Antibody response to pertussis toxin in patients with clinical pertussis measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988;7:149-54.

- 
379. Edwards KM, Lawrence E, Wright PF. Diphtheria, tetanus, and pertussis vaccine: a comparison of the immune response and adverse reactions to conventional and acellular pertussis components. *Am J Dis Child* 1986;140:867-71.
380. Redd SC, Rumschlag HS, Biellik RJ, Sanden GN, Reimer CB, Cohen ML. Immunoblot analysis of humoral immune responses following infection with *Bordetella pertussis* or immunization with diphtheria-tetanus-pertussis vaccine. *J Clin Microbiol* 1988;26:1373-77.
381. Lehtonen OP, Eerola E. The effect of different antibody affinities of ELISA absorbance and titer. *J Immunol Methods* 1982;54:233-40.
382. Altemeier WA, Ayoub EM. Erythromycin prophylaxis for pertussis. *J Pediatr* 1977;75:768-81.
383. Grob PR, Spencely M, Lambert HP. Whooping cough in infants: antimicrobial prophylaxis?. *Lancet* 1981;1:772-3.
384. Halsey NA, Welling MA, Lehman RM. Nosocomial pertussis: a failure of erythromycin treatment and prophylaxis. *Am J Dis Child* 1980;134:521-2.
385. Grob PR, Crowder MJ, Robbins JF. Effect of vaccination on severity and dissemination of whooping cough. *Br Med J* 1981;292:1925-8.



- 
386. Grob PR. Prophylactic eritromycin for whooping cough contacts. *Lancet* 1981;1:172.
387. Medical Research Council. A report of the whooping-cough subcommittee of the antibiotics clinical trials (non- tuberculous conditions) committee of the Medical Research Council. Treatment of whooping-cough with antibiotics. *Lancet* 1952;1:1110-2.
388. Wehrle PF, Lepper MH, Bundesen HN. Aureomycin treatment of pertussis results in 137 patients. *J Pediatr* 1951;39:435-41.
389. Robinson DA, Mandal BK, Ironside AG, Dunbar EM. Whooping- cough-a study of severity in hospital case. *Arch Dis Child* 1981;56:687-91.
390. Zackrisson G, Lagergård T, Trollfors B, Krantz I. Immunoglobulin A antibodies to pertussis toxin and filamentous hemagglutinin in saliva from patients with pertussis. *J Clin Microbiol* 1990;28:1502-5.
391. Granström G, Askelöf P, Granström M. Specific immunoglobulin A to *Bordetella pertussis* antigens in mucosal secretion for rapid diagnosis of whooping cough. *J Clin Microbiol* 1988;26:869-74.
392. Nicoll A, Gardner A. Whooping cough and unrecognized postperinatal mortality. *Arch Dis Child* 1988;63:41-7.

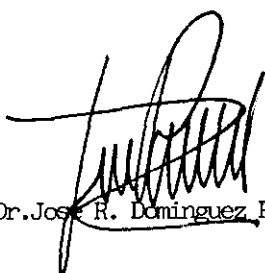
393. Heininger U, Stehr K, Cherry JD. Serious pertussis overlooked in infants. Eur J Pediatr 1992;151:342-3.

## INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

El Prof. D. Juan J. Picazo de la Garza, Catedrático de Microbiología I, de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y el Dr.D. José Ramón Domínguez Pérez, Doctor en Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, INFORMAN:

Que el trabajo titulado "Utilidad de la Serología en el diagnóstico de las Infecciones Causadas por la Bordetella pertussis.", realizado por D.ENRIQUE -- BERGON JIMENEZ, se ha llevado a cabo bajo nuestra dirección y reúne las condiciones exigibles para ser presentado como Tesis Doctoral.

V.º B.º  
EL TUTOR (2)



Fdo.: \_\_\_\_\_ Fdo. Dr. José R. Domínguez Pérez  
(fecha y firma)  
D.N.I.: DNI: 35811128

El Director de la Tesis



Fdo.: \_\_\_\_\_ Prof. J.J. Picazo de la Garza  
(fecha y firma)  
D.N.I.: 22476920-G

## INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

Una vez revisada la solicitud del Doctorando y teniendo en cuenta el Informe del Director de la Tesis Doctoral, el dictamen del Consejo de Departamento es favorable a la concesión de la lectura de la Tesis Doctoral.

Fecha reunión  
Consejo Departamento

16-Enero-1994

El Director del Departamento



Fdo.: JOSE PRIETO PRIETO.  
(fecha y firma)